

Erzeugung und Analyse einer Mausmutante zur Aufklärung der Funktion der ZO-1-Bindedomäne des Connexin43-Proteins

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades (Dr. rer. Nat.)
der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der
Rheinischen-Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

vorgelegt von
Robert Pascal Requardt
aus
Velbert

Bonn, 2008

Angefertigt mit Genehmigung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Rheinischen-Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

Erscheinungsjahr 2009

Diese Dissertation ist auf dem Hochschulschriftenserver der ULB Bonn unter http://hss.ulb.uni-bonn.de/diss_online elektronisch publiziert.

Erstgutachter:	Prof. Dr. Klaus Willecke
Zweitgutachter:	Prof. Dr. Karl-Heinz Scheidtmann

Tag der Promotion: 16.02.2009

Erklärung

Hiermit versichere ich, dass diese Dissertation von mir selbst und ohne unerlaubte Hilfe angefertigt worden ist. Es wurden keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel benutzt. Ferner erkläre ich, dass die vorliegende Arbeit an keiner anderen Universität als Dissertation eingereicht worden ist.

Bonn, Oktober 2008

Robert Pascal Requardt

**Wissenschaft braucht keine Wissenschaftsgläubigkeit, um neues
Wissen zu schaffen, sondern geistige Freiheit.**

Josef H. Reichholf

Danksagung

Herrn Prof. Dr. Klaus Willecke danke ich für die Überlassung des interessanten Themas sowie für die stete Diskussionsbereitschaft und Begutachtung dieser Arbeit.

Herrn Prof. Dr. Karl-Heinz Scheidtmann danke ich für die Übernahme des Koreferats.

Herrn PD Dr. Gregor Kirfel und Frau PD Dr. Gerhild van Echten-Deckert danke ich für die Bereitschaft, der Promotionskommission als fachnahe und -angrenzende Mitglieder zur Verfügung zu stehen.

Für die freundliche und engagierte Kooperation möchte ich mich besonders bei Prof. Dr. Christian Steinhäuser, Prof. Dr. Feliskas F. Bukauskas, Dr. Martin Theis, Dr. Jung-Sun Kim, Dr. Anke Wallraff und Dr. Andreas Waha bedanken.

Den ehemaligen und jetzigen Mitarbeitern des Instituts für Genetik danke ich für die kollegiale und freundliche Zusammenarbeit sowie die stete Diskussions- und Hilfsbereitschaft bei wissenschaftlichen und technischen Fragen. Besonderen Dank bekunde ich Markus Kretz, Thorsten Höher, Radek Dobrowolski, Oliver Tress und Julia von Maltzahn. Darüber hinaus möchte ich mich für die herzliche Atmosphäre bei allen aktuellen und ehemaligen Mitgliedern der Labore 816 und 712 bedanken.

Insbesondere möchte ich mich für die hervorragende technische Unterstützung bei Melanie Jokwitz und Petra Kußmann bedanken. Für die Erzeugung transgener Mäuse durch Blastozysteninjektion danke ich Christine Siegmund. Für die Hilfe bei der Erzeugung und Pflege Cx43 transgener Tiere danke ich Dr. Joachim Degen. Bei Jiong Zhang und Indra Lübke meier bedanke ich mich für die weiterführende Arbeit an der Cx43D378stop-Maus.

Darüber hinaus danke ich Philipp Wörsdörfer und Michael Lange für die Fußball-Unterhaltungen, der morgendlichen Kaffeerrunde für die angenehmen Gespräche und Gertrud Dienst für all die kleinen Gefälligkeiten.

Besonders bedanken möchte ich vor allem bei meiner Familie. Meinen Eltern und meiner Lebensgefährtin Maria Garz danke ich für ihre uneingeschränkte Unterstützung, letzterer insbesondere auch für ihre Geduld und die aufmunternden Worte. Meinem Sohn Moritz danke ich dafür, dass er mir jeden Tag zeigt, wie schön das Leben ist.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	1
1.1	Gap Junctions	1
1.1.1	Aufbau und Topologie der Gap Junction-Kanäle	1
1.1.2	Funktion der Gap Junction-Kanäle	4
1.1.3	Regulation der Gap Junction-Kanäle	4
1.2	Cx43 Gap Junction-Kanäle	5
1.2.1	Regulation der Gap Junction-Kanäle des Cx43.....	5
1.2.2	Interaktion von Cx43 mit anderen Proteinen	5
1.2.2.1	Interaktion des Cx43 mit dem Zonula Occludens Protein-1 („ZO-1“).....	9
1.2.2.2	Interaktion des Cx43 mit α/β -Tubulin	12
1.2.2.3	Interaktion des Cx43 mit CIP85	13
1.2.3	Regulation des Cx43 durch Phosphorylierung.....	13
1.2.4	Regulation der GJC über den intramolekularen „Ball und Kette“- Mechanismus.....	15
1.2.5	Regulation des Cx43 durch eine veränderte cAMP- und Kalzium- Konzentration	16
1.2.6	Regulation der Wachstumskontrolle durch den C-Terminus von Cx43	17
1.2.7	Expression des Cx43 während der Embryonalentwicklung.....	17
1.2.7.1	Embryonale und postnatale Expression von Cx43 im Herzen der Maus....	17
1.2.8	Expression von Cx43 in der adulten Maus	18
1.3	Cx43-Mausmutanten.....	18
1.4	Zonula Occludens-Proteine	20
1.5	Erzeugung transgener Mäuse und die Verwendung von eGFP als Reportergen ..	22
1.5.1	Erzeugung transgener Mäuse durch homologe Rekombination.....	23
1.5.2	Das Cre-loxP- und Flp-frt-System.....	23
1.5.3	Verwendung von eGFP als Reportergen	23
1.5.4	Verwendung einer Internen Ribosomen Eintrittsstelle	24
1.6	Ziel der Arbeit	26
2	Material.....	27
2.1	Stammlösungen, Puffer und Medien	27
2.1.1	Allgemeine Lösungen	27
2.1.2	Lösungen für Arbeiten mit Nukleinsäuren.....	27
2.1.3	Medien und Lösungen für die Bakterienkultur	28
2.1.4	Herstellung transformationskompetenter Bakterien.....	29
2.1.5	Lösungen für die Proteinanalytik	29
2.1.6	Lösungen für den Nachweis der LacZ-Expression in Gehirnschnitten	31
2.1.7	Medien und Lösungen für die Kultur von HeLa-Zellen.....	31
2.1.8	Medien und Lösungen für die Kultur embryonaler Stammzellen	32
2.1.9	Lösungen für die Mikroinjektion und Nachweisverfahren	33
2.1.10	Anästhetikum	33
2.1.11	Kommerzielle Lösungen	33
2.2	Kommerzielle Reagenzienansätze (Kits).....	34
2.3	Antikörper	35
2.3.1	Primärantikörper	35
2.3.2	Sekundärantikörper	35
2.4	Nukleinsäuren	35
2.4.1	Oligonukleotide als Startermoleküle für die Polymerase-Kettenreaktion	35
2.4.2	Klonierungsvektoren	37
2.4.3	Rekombinante Plasmide	37
2.4.4	Plasmide zur Herstellung von Southernblot-Sonden	38
2.5	Bakterienstämme	38
2.6	Zell-Linien	38

2.7	Maus-Linien	39
2.8	Allgemeine Labormaterialien	39
2.9	Geräte.....	40
2.10	Größenstandards	41
3	Methoden.....	43
3.1	Methoden der Analyse von Nukleinsäuren.....	43
3.1.1	Isolierung von Plasmid-DNS aus Bakterien	43
3.1.1.1	Analytische Plasmid-Isolierung aus Bakterien (Minipräparation).....	43
3.1.1.2	Analytische Plasmid-Isolierung aus Bakterien (Midipräparation).....	43
3.1.1.3	Endotoxinfreie Plasmid-Isolierung aus Bakterien (Maxipräparation)	44
3.1.2	Isolierung genomischer DNS	44
3.1.2.1	DNS-Gewinnung für PCR-Tests aus HeLa-Zellen.....	44
3.1.2.2	DNS-Gewinnung für PCR-Tests aus embryonalen Stammzellen.....	44
3.1.2.3	DNS-Gewinnung aus Mausschwanzspitzen für die Genotypisierung.....	44
3.1.2.4	DNS-Gewinnung für die Southernblot-Analyse aus embryonalen Stammzellen	45
3.1.2.5	DNS-Gewinnung für die Southernblot-Analyse aus der Leber von Mäusen	45
3.1.3	Agarose-Gelelektrophorese	46
3.1.3.1	Größenfraktionierung nativer DNS.....	46
3.1.4	DNS-Transfer (Southernblot).....	46
3.1.4.1	Herstellung radioaktiver Sonden mit dem Multiprime-Reagenziensatz	47
3.1.4.2	Hybridisierung und Nachweis der radioaktiven DNS-Sonde.....	47
3.1.5	Aufreinigung von DNS aus Agarosegelen	48
3.1.6	Natriumacetat-Fällung von DNS	48
3.1.7	Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren	49
3.1.7.1	Photometrische Konzentrationsbestimmung	49
3.2	Polymerase-Kettenreaktion.....	49
3.2.1	Ableiten von PCR-Startermolekülen (Primerdesign).....	49
3.2.2	Mutagenese-PCRs zur Amplifikation von Cx43-Deletionsmutanten.....	50
3.2.2.1	Mutagenese-PCR zur Amplifikation der Cx43D378stop-Mutation	50
3.2.2.2	Mutagenese-PCR zur Amplifikation der Cx43(Δ 234-243)-Mutation	51
3.2.2.3	Mutagenese-PCR zur Amplifikation der Cx43(Δ 254-257)-Mutation	51
3.2.3	PCR-Analyse zum Nachweis der homologen Rekombination des Cx43D378stopKI-Vektors in ES-Zellen	52
3.2.4	PCR-Analyse transgener Mäuse	53
3.2.4.1	PCR-Nachweis des Cx43D378stop-Transgens.....	53
3.2.4.2	PCR-Nachweis des deletierten Cx43-Allels.....	53
3.2.4.3	PCR-Nachweis gefloxter Cx43-Allele	54
3.2.4.4	PCR-Nachweis des Cx43K258stop Transgens	54
3.2.4.5	PCR-Nachweis des Cx30 Knock-outs (KO's).....	54
3.2.4.6	PCR-Nachweis des α MHC-Cre Transgens.....	55
3.2.4.7	PCR-Nachweis des hGFAP-Cre Transgens.....	55
3.2.4.8	PCR-Nachweis des PGK-Cre Transgens	55
3.2.4.9	PCR-Nachweis des deleter FLP Transgens	56
3.3	Enzymatische Modifikation und Rekombination von DNS	56
3.3.1	Spaltung doppelsträngiger DNS mit Restriktionsendonukleasen	56
3.3.2	Herstellung von glatten Doppelstrangenden (Blunten)	56
3.3.3	Dephosphorylierung von Vektorenden	56
3.3.4	Ligation der doppelsträngigen DNS-Fragmente	57
3.4	Transformation von Bakterienzellen	57
3.4.1	Herstellung transformationskompetenter Bakterien.....	58
3.4.2	Transformation von <i>E.coli</i> -Bakterien.....	58
3.4.3	Transformation von MM294-Flp und MM294-Cre <i>E. coli</i> -Bakterien.....	58

3.4.4	Identifizierung rekombinanter Klone	59
3.4.5	Anlegen von Glyzerolkulturen	59
3.5	Zellkultur	59
3.5.1	Kultivierung von HeLa-Zellen	59
3.5.1.1	Allgemeine Kulturbedingungen	60
3.5.1.2	Auftauen von HeLa-Zellen	60
3.5.1.3	Stabile Transfektion von HeLa-Zellen durch Lipofektion	60
3.5.1.4	Selektion und Isolierung einzelner Klone	61
3.5.1.5	Einfrieren von HeLa-Zellen	61
3.5.2	Kultivierung von ES-Zellen	61
3.5.2.1	Allgemeine Kulturbedingungen	61
3.5.2.2	Auftauen von ES-Zellen	62
3.5.2.3	Elektroporation von ES-Zellen	62
3.5.2.4	Selektion der ES-Zellklone	63
3.5.2.5	Einfrieren von ES-Zellen	63
3.6	Arbeiten zur Charakterisierung von HeLa-Transfektanten	64
3.6.1	Visueller Nachweis des grünfluoreszierenden Proteins (GFP) in lebenden HeLa-Zellen	64
3.6.2	Indirekte Immunfluoreszenz-Analyse an HeLa-Zellen	64
3.6.2.1	Fixierungsmethoden der HeLa-Zellen	65
3.6.3	Mikroinjektion in HeLa-Zellen	65
3.6.4	Proteinanalytik	66
3.6.4.1	Herstellung von HeLa-Zell-Lysaten	66
3.6.4.2	Herstellung von Gewebelysaten	67
3.6.4.3	Bestimmung der Proteinkonzentration von Proteinlysaten	67
3.6.4.4	Diskontinuierliche SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese (SDS-PAGE)	67
3.6.4.5	Anfärben von SDS-Polyacrylamidgelen mit Coomassie Brilliant Blue™	68
3.6.4.6	Western blot	69
3.6.4.6.1	Nassblot	69
3.6.4.6.2	Semi-Dry blot	69
3.6.4.7	Ponceau-Färbung	69
3.6.4.8	Immunoblot-Analyse mittels Chemilumineszenz (ECL)	69
3.6.4.9	Entfernen gebundener Antikörper von der Nitrozellulosemembran	70
3.7	Indirekte Fluoreszenz-Analysen an Gewebeschnitten	70
3.7.1	Herstellung von Gefrierschnitten	70
3.7.2	Immunfluoreszenzen an Gefrierschnitten	70
3.7.3	β-Galaktosidase-Nachweis an Gefrierschnitten	71
3.8	Arbeiten zur Charakterisierung homolog rekombinierter ES-Zellen	71
3.8.1	Southern blot-Analyse rekombinanter ES-Klone	71
3.8.2	Karyotyp-Analyse homolog rekombinierter ES-Zellklone	72
3.9	Zucht und Haltung von Mäusen	72
3.9.1	Blastozysteninjektion und Uterustransfer	73
3.9.1.1	Superovulation	73
3.9.1.2	Blastozysteninjektion und Uterustransfer	73
4	Ergebnisse	74
4.1	Erzeugung der Cx43-Deletionsmutanten durch PCR-Mutagenese	74
4.1.1	Erzeugung der Cx43D378stop-Mutation	74
4.1.2	Erzeugung der Cx43 _(Δ234-243) -Mutation zur Ablation der Tubulin-Interaktionsdomäne des Cx43-Proteins	77
4.1.3	Erzeugung der Cx43 _(Δ253-256) -Mutation zur Ablation der CIP85-Interaktionsdomäne des Cx43-Proteins	77
4.1.4	Datenbankanalyse der verschiedenen Deletionsmutanten	77
4.2	Erzeugung und Charakterisierung der Cx43-Deletionsmutanten	78
4.2.1	Klonierung der HeLa-Vektoren	78

4.2.1.1	Klonierung des Cx43D378stop HeLa-Vektors	79
4.2.1.2	Klonierung der Cx43 _(Δ234-243) - und Cx43 _(Δ253-256) -HeLa-Vektoren	80
4.2.2	Nachweis des verstärkten grün fluoreszierenden Proteins („eGFP“) in transfizierten HeLa-Zellen	82
4.2.3	Indirekte Immunfluoreszenz der HeLa-Cx43-Ablationsmutanten	83
4.2.3.1	Doppelimmunfluoreszenzanalyse von HeLa-Cx43WT-Zellen	84
4.2.4	Immunoblotanalyse der verschiedenen Cx43-Ablationsmutanten.....	85
4.2.5	Funktionsanalyse der Gap Junction-Kanäle mit Hilfe der Mikroinjektion.....	87
4.3 Erzeugung und Charakterisierung Cx43D378stop exprimierender ES-Zellen der	
 Maus	90
4.3.1	Klonierung des KI-Vektors	90
4.3.2	Funktionsanalyse der loxP- und frt-Stellen des Cx43D378stopKI-Vektors.....	94
4.3.3	Etablierung von PCRs zum Test auf homologe Rekombination in ES-Zellen	95
4.3.4	ES-Zellkultur	95
4.3.5	Southernblot-Analyse der ES-Zellklone	96
4.3.6	Karyotyp-Analyse.....	99
4.4	Erzeugung und Zucht transgener Mäuse mit ablatierter ZO-1-Bindedomäne.....	100
4.4.1	Erzeugung chimärer Mäuse durch Blastozysteninjektion homolog rekombinierter ES-Zellen	100
4.4.2	Überprüfung transgener Mäuse mit Hilfe der PCR-Analytik	101
4.5	Analyse der transgenen Cx43D378stop Tiere.....	103
4.5.1	Überlebenswahrscheinlichkeit der CX43D378stop Tiere	103
4.6	Funktionsanalyse der Cre-Rekombinase unter der Kontrolle des hGFAP-	
 Promotors in Cx30 ^{-/-} ;Cx43 ^{fl/fl} :hGFAP-Cre-Mäusen	105
4.6.1	Funktionsüberprüfung der hGFAP-Cre-Rekombinase mit Hilfe der Westernblot-Analyse	105
4.6.2	Funktionsanalyse des hGFAP-Cre Promotors mittels <i>LacZ</i> -Färbung.....	106
4.6.3	Untersuchung des Methylierungszustandes des hGFAP-Promotors.....	107
5	Diskussion	109
5.1	Erzeugung verschiedener Cx43-Ablationsmutanten	109
5.1.1	Erzeugung der Cx43D378stop-Ablationsmutante	109
5.1.2	Erzeugung der Cx43 _(Δ234-243) -Ablationsmutante zur Ablation der Tubulin-Interaktionsdomäne des Cx43-Proteins	109
5.1.3	Erzeugung der Cx43 _(Δ253-256) -Ablationsmutante zur Ablation der CIP85-Interaktionsdomäne des Cx43-Proteins	110
5.2	Klonierung und Einsatz der Vektoren	110
5.2.1	Verwendung einer IRES Sequenz	110
5.2.2	Verwendung des Reportergens eGFP.....	111
5.2.3	Verwendung des Antibiotikums Zeozin.....	112
5.2.4	Die HeLa-Vektoren	112
5.2.5	Der Cx43D378stopKI-Vektor	113
5.3	Untersuchungen der Cx43-Ablationsmutanten in HeLa-Zellen.....	113
5.3.1	Untersuchungen des Cx43D378stop-Proteins in HeLa-Zellen	113
5.3.2	Untersuchungen des Cx43 _(Δ253-256) -Proteins in HeLa-Zellen	113
5.3.3	Untersuchungen des Cx43 _(Δ234-243) -Proteins in HeLa-Zellen	115
5.4	Southernblot-Analyse der PCR positiven ES-Zellklone	116
5.5	Hemizygot Cx43 ^{del/fl} D378stop: αMHC-Cre und homozygot Cx43 ^{fl/fl} D378stop/flD378stop: αMHC-Cre Tiere mit früher postnatalen Letalität.....	116
5.6	Überprüfung der Zuverlässigkeit der Cre-Rekombinase unter Kontrolle des hGFAP-Promotors in Cx30 ^{-/-} ;Cx43 ^{fl/fl} :hGFAP-Cre-Mäusen	120

6	Ausblick	122
6.1	Weitere Untersuchungen an Cx43 _(Δ234-243) exprimierenden HeLa-Zellen.....	122
6.2	Weitere Untersuchungen an Cx43 _(Δ253-256) exprimierenden HeLa-Zellen.....	122
6.3	Weitere Untersuchungen an Cx43D378stop exprimierenden Zellen.....	123
6.4	Ausblicke auf weitere Untersuchungen zum letalen Phänotyp hemizygoter Cx43 ^{del/f1378stop} .αMHC-Cre- und homozygoter Cx43 ^{f1D378stop/f1D378stop} .αMHC-Cre- Tiere.....	124
6.5	Southernblot-Analyse der Cx43D378stop-Tiere.....	126
6.6	Ausblick auf die Auswirkungen der Cx43D378stop-Expression in anderen Gewebe durch die Verpaarung verschiedener Cre-Rekombinase tragender Tiere	127
7	Zusammenfassung	129
8	Literaturverzeichnis	130
9	Anhang	150

Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celcius
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer
µM	Mikromolar
µF	Mikrofarad
AA	Acrylamid
A. bidest	zweifach destilliertes Wasser
Abb.	Abbildung
abs.	absolut
Amp	Ampicillin(-Resistenzgen)
APS	Ammoniumpersulfat
AS	Aminosäure
ATP	Adenosintriphosphat
Ax	Absorption bei Wellenlänge x in nm
BCA	bicinchoninic acid
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin
ca.	ungefähr
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
CDC2	Cell division cycle Protein 2
CIP85	connexin interacting protein (85 kDa)
cm	Zentimeter
CMV	Cytomegalovirus
Cx	Connexin
Da	Dalton
DAB	Diaminobenzidin-Lösung
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
dCTP	Desoxycytidintriphosphat
DEPC	Diethylpyrocarbonat
dGTP	Desoxyguanosintriphosphat
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNase	Desoxyribonuklease
DNS	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Deoxynukleotidtriphosphat
dpc	dies post coitum
DTT	Dithiothreitol
dTTP	Desoxythymidintriphosphat
E. coli	Escherichia coli
ECL	enhanced chemo luminescence
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
eGFP	Grün fluoreszierendes Protein (enhanced Green Fluorescent Protein)
EGTA	Ethylenglykol-bis(2-aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraessigsäure
et al.	et altera = und andere
EtBr	Ethidiumbromid
EtOH	Ethanol
FCS	fötales Kälberserum
FSH	Follikel stimulierendes Hormon
g	Gramm
g	Erdanziehungskraft
Gja1	Gap Junction Protein alpha 1

HBS	HEPES buffer saline
hCG	humanes Choriongonadotropin
HEPES	(4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid
hGFAP	human glial fibrillary acidic protein
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid
IRES	Interne ribosomale Eintrittsstelle (engl.: internal ribosomal entry site)
kb	Kilobasenpaare
kDa	Kilodalton
KI	Knock-in
Ko-IP	Ko-Immunpräzipitation
Konz.	Konzentration
kV	Kilovolt
l	Liter
LB-Medium	Luria-Bertani-Medium
LIF	Leukämie inhibierender Faktor
Lsg.	Lösung
LSM	Laser Scan Mikroskop
M	Molar
mA	Milli Ampere
MAPK	Membran assoziierte Proteinkinase
MCS	Vielfachklonierungsstelle (eng.: multiple cloning site)
mCx	murines Connexin
mg	Milligramm
min	Minute(n)
Mio	Millionen
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mM	Millimolar
mRNS	Boten-RNS (eng.: messenger RNA)
N	normal
n.b.	nicht bekannt
nA	Nano Ampere
NAD+	Nicotinamindinukleotid
ng	Nanogramm
NGS	newborn goat serum
nM	Nanomolar
nm	Nanometer
NMR-	Spektroskopie Kernmagnetresonanzspektroskopie
nt	Nukleotide
OD _x	optische Dichte Wellenlänge von x nm
ori	origin of replication
p	Plasmid
p.a.	per analysis
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PFA	Paraformaldehyd
pgk	Phosphoglycerin Kinase
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Protonenkonzentration
pmol	picomol
PO	Peroxidase
PTD	Proteintransduktionsdomäne
RT	Raumtemperatur
SAP	Shrimp Alkaline Phosphatase

SDS	Natriumdodecylsulfat
sec	Sekunden
s.g.	so genannte
Std.	Stunde(n)
Tab.	Tabelle
TBE	Tris-Borat-EDTA-Puffer
TBS	Tris-gepufferte Salzlösung
TBS-T	TBS plus Tween
TE	Tris-EDTA
TEMED	N, N, N', N'-Tetramethylethyldiamin
Tris	Tris-(hydroxymethyl-)aminomethan
U	Enzymeinheit (engl.: unit)
u.a.	unter anderem
UDP	Uracildiphosphat
ü.N.	über Nacht
Upm	Umdrehungen pro Minute
usw.	und so weiter
UV	Ultraviolett
V	Volt
v	Volumen
v/v	Volumen pro Volumen
Verd.	Verdünnung
VE-Wasser	vollentsalztes Wasser
Vol.	Volumen
w/v	Gewicht pro Volumen
-x	-fach
z.B.	zum Beispiel

1 Einleitung

In vielzelligen Organismen ist die Ausbildung von Zellverbindungen eine Grundvoraussetzung, um eine mechanische Stabilität und eine spezifische Interaktion zwischen den einzelnen Zellen eines Gewebes zu gewährleisten. Diese Zellverbindungen lassen sich in drei funktionale Gruppen einteilen: Abschlussverbindungen (Tight Junctions/Zonula occludens) bilden eine Diffusionsbarriere in polarisierten epithelialen Gewebe. Haftverbindungen (Adherens Junctions/Zonula adhaerens und Desmosomen/Macula adhaerens) sorgen für die Stabilität eines Gewebes durch die Verbindung des Zytoskeletts über Zellgrenzen hinweg. Kommunizierende Verbindungen (Gap Junctions/Nexus) werden im Folgenden genauer vorgestellt.

1.1 Gap Junctions

Die Zytoplasmata benachbarter Zellen werden durch Gap Junctions miteinander verbunden. Die Bezeichnung Gap Junctions (englisch „gap“ = Lücke und „junction“ = Verbindung) leitet sich aus den elektronenmikroskopischen Beobachtungen ab, in denen zu erkennen ist, dass sich die Zellmembranen benachbarter Zellen im Bereich der Zellverbindungen auf 2 bis 5 nm, statt der normalen 20 bis 30 nm annähern (Revel und Karnovsky, 1967).

Sowohl bei Invertebraten als auch bei Vertebraten gibt es Genfamilien, die für die Proteine kodieren, aus denen die Zellverbindungen aufgebaut sind. Wobei sich die Familienmitglieder untereinander in Struktur und Funktion ähneln. Bei Invertebraten bestehen die Gap Junctions aus Innexinen (Bauer et al., 2005; Phelan, 2005), bei Vertebraten aus Connexinen (Willecke et al., 2002). Homolog zu den Innexinen sind bei Vertebraten die Pannexine nachgewiesen worden (Panchin, 2005; Shestopalov und Panchin, 2008). Die verschiedenen Formen kommunikativer Zellverbindung sind vermutlich durch konvergente Evolution entstanden. Im weiteren Verlauf dieser Arbeit werden ausschließlich die Connexine weiter beschrieben.

1.1.1 Aufbau und Topologie der Gap Junction-Kanäle

Eine Ansammlung von Gap Junction-Kanälen, wobei diese aus wenigen bis mehreren tausend Einzelkanälen bestehen können, wird als Gap Junction-Plaques bezeichnet (Abb. 1.1). Im Inneren der Kanäle befindet sich eine hydrophile Pore, über welche die benachbarten Zellen miteinander verbunden sind. Ein Gap Junction-Kanal besteht aus zwei Halbkanälen (Connexonen), welche wiederum aus sechs Untereinheiten (Connexinen) aufgebaut sind (Willecke et al., 2005).

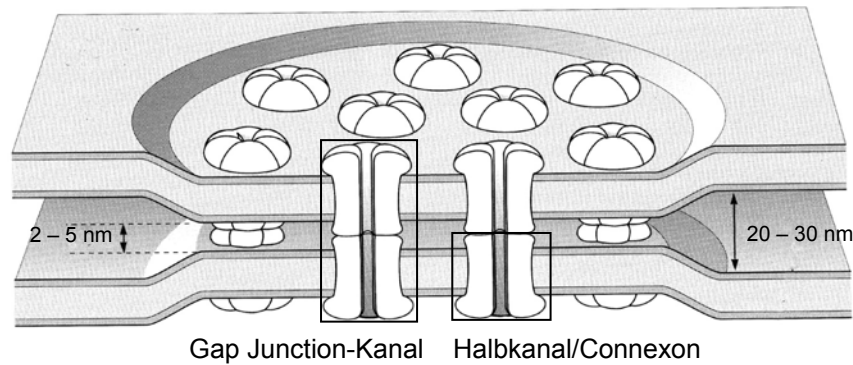


Abb. 1.1: Schematische Darstellung eines Gap Junction-Plaques. Hervorgehoben sind ein Gap Junction-Kanal und ein Halbkanal. Zu erkennen ist, dass der Abstand zwischen den Membranen zweier benachbarter Zellen in einem Gap Junction-Plaques sich von 20 bis 30 nm auf 2 bis 5 nm verringert (verändert nach Kandel et al., 1995).

Jedes Connexin-Protein besteht aus vier α -helikalen Transmembrandomänen, einer zytoplasmatischen und zwei extrazellulären Schleifen, sowie einem zytoplasmatischen N- und C-Terminus (Mese et al., 2007; Abb. 1.2).

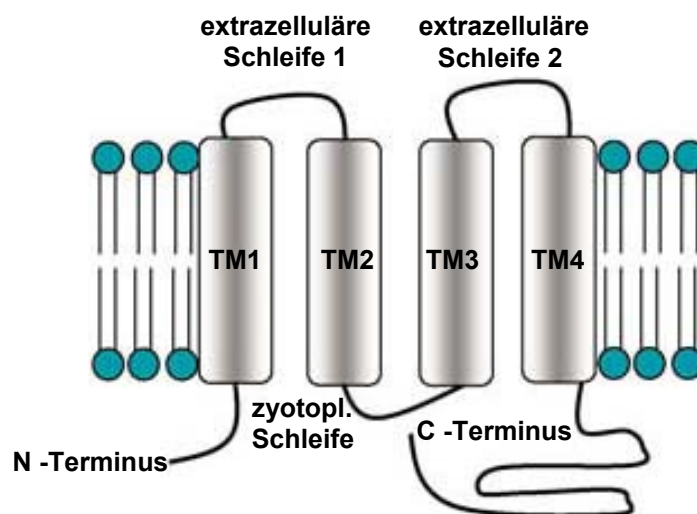


Abb. 1.2: Topologie eines Connexins (verändert nach Wagner et al., 2008). Ein Connexin besteht aus vier α -helikalen Transmembrandomänen, einer zytoplasmatischen und zwei extrazellulären Schleifen, einem zytoplasmatischen Amino- (N-)Terminus und einem Carboxy- (C-)Terminus. In jeder extrazellulären Schleife befinden sich drei konservierte Cysteinreste, die über Disulfidbrückenbindungen zur Stabilisierung und Anbindung zweier Connexone beitragen.

In den beiden extrazellulären Schleifen befinden sich drei konservierte Cysteinreste, welche für das Aneinanderlagern der Halbkanäle zu einem Gap Junction-Kanal von entscheidender Bedeutung sind.

Gap Junction-Kanäle können aus zwei identischen Connexonen aufgebaut sein, sie werden dann als homotypisch bezeichnet. Werden sie aus 2 unterschiedlichen Connexonen

zusammengesetzt, werden sie als heterotypisch bezeichnet. Connexone, die nur aus einem Connexintyp bestehen, bilden homomere Kanäle (Willecke et al., 2002; Abb. 1.3).

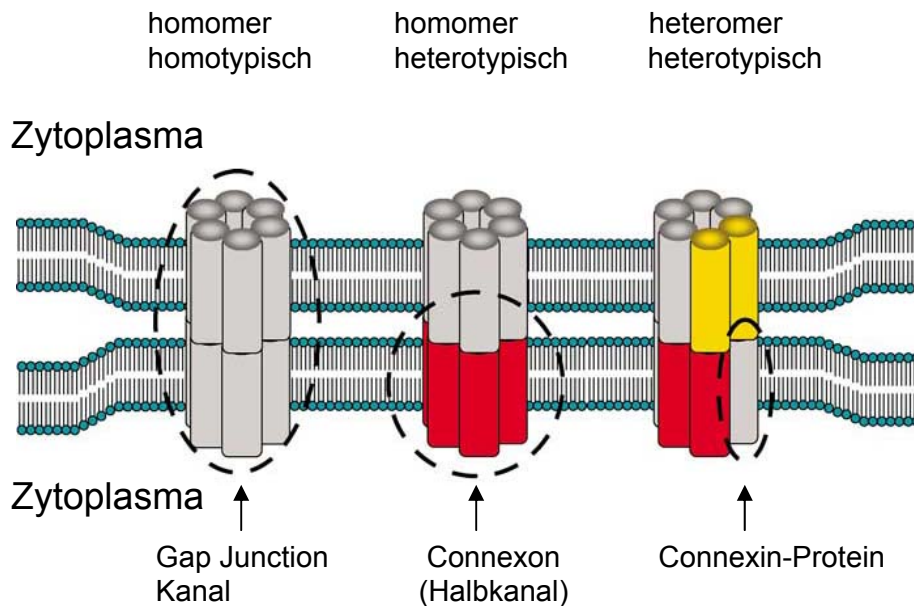


Abb. 1.3: Schematische Darstellung verschiedener Connexin-Kanäle (verändert nach Wagner et al., 2008). Ein Gap Junction-Kanal wird aus zwei Connexonen benachbarter Zellen gebildet, dabei können homomer homotypische, homomer heterotypische oder heteromer heterotypische Kanäle entstehen.

Im Genom von Nagern wurden 20 und beim Menschen 21 verschiedene Connexingene identifiziert; bis auf die Ausnahmen Connexin25 (Cx25) und Connexin33 (Cx33) bilden sie orthologe Paare (Willecke et al., 2005). Die Connexine werden nach ihrer theoretischen molekularen Masse in Kilodalton (kDa) benannt, wobei ein kleiner vorangestellter Buchstabe (z.B. m für Maus und h für Mensch) die Spezies anzeigt. Aufgrund der Sequenzhomologie der zytoplasmatischen Schleife werden die Connexingene in fünf verschiedene Gruppen eingeteilt. Die einzelnen Gruppenmitglieder werden zuerst mit „GJ“ abgekürzt und anschließend in der Reihenfolge ihrer Erstbeschreibung mit einer Zahl gekennzeichnet. Das Gen, welches für das hauptsächlich in dieser Arbeit beschriebene Connexin43 (Cx43) kodiert, wird als GJA1 im Menschen bezeichnet (bzw. Gja1 bei der Maus) (<http://www.genenames.org/genefamily/gj.php> für die humanen und <http://www.informatics.jax.org> [Stichwort Connexine] für die murinen Connexine).

Die größten Unterschiede zwischen den verschiedenen Connexinen sind in der zytoplasmatischen Schleife sowie im C-Terminus zu finden (Saez et al., 2003). Beide üben einen Einfluss auf die Kanaleigenschaften aus. So ist der C-Terminus beim Cx26 16 Aminosäurereste (Zhang und Nicholson, 1989) und beim Cx57 269 Aminosäurereste (Hombach et al., 2004) lang. Ein Großteil der bislang beschriebenen Interaktionsproteine,

darunter ZO-1, bindet an den C-Terminus der Connexine (Giepmans et al., 1998; Toyofuku et al., 1998). Im Golgi-Apparat erfolgt die Oligomerisierung der meisten Connexine (Laird, 2006). Von dort gelangen sie als Halbkanäle zur Membran, wo sie an der Peripherie bestehender Gap Junction-Plaques eingebaut und stabilisiert werden (Gaietta et al., 2002). Der Abbau der Connexine erfolgt über annuläre Gap Junctions und weiter über den proteasomalen und lysosomalen Abbauweg (Musil et al., 2000; Jordan et al., 2001).

1.1.2 Funktion der Gap Junction-Kanäle

Gap Junction-Kanäle ermöglichen eine metabolische und elektrische Kopplung benachbarter Zellen. Durch sie können Ionen, Zweitbotenstoffe wie Ca^{2+} oder cAMP (Bedner et al., 2006), Metabolite und kurze Peptide bis zu einer Größe von bis zu 1,8 kDa diffundieren (Neijssen et al., 2005). Darüber hinaus wurde der Transport kurzer siRNS Moleküle nachgewiesen (Valiunas et al., 2005). Zudem scheinen die Kanäle bei Säugetieren entscheidend für die Embryogenese und Aufrechterhaltung der Funktion vieler Organe zu sein (Bennett und Verselis, 1992). Unterschiede in der Permeabilität und der Einzelkanalleitfähigkeit sind bedingt durch die Zusammensetzung aus verschiedenen Connexin-Isoformen (Goldberg et al., 2004; Mese et al., 2007). In Eukaryoten sind fast alle Zellen über Gap Junction-Kanäle miteinander verbunden, z.B. im Herzen, in dem sie die synchrone Kontraktion gewährleisten (Severs et al., 2004) oder im neuronalen Gewebe, wo sie der Synchronisation der Neurone sowie der schnellen Reizweiterleitung dienen (Zoidl und Dermietzel, 2002; Landisman et al., 2002). Ausnahmen bilden davon nur Erythrozyten, Spermien und adulte Skelettmuskelfasern (Willecke et al., 2002), wobei die jeweiligen Vorläuferzellen ebenfalls Connexine exprimieren. In den letzten Jahren wurden Indizien entdeckt, die darauf hinweisen, dass es neben Gap Junction-Vollkanälen auch funktionale Halbkanäle gibt, die unter anderem der ATP-Ausschüttung dienen (Stout et al., 2004; Dobrowolski et al., 2006). Es gibt Hinweise, dass der C-Terminus des Cx43 einen Einfluss auf die Proliferation von Kardiomyozyten und HeLa-Zellen im Kern ausübt (Dang et al., 2003). Cx43 wurde in der inneren Membran von Mitochondrien entdeckt, wo es vermutlich eine Rolle zum Schutz des Herzens bei Ischämie spielt (Boengler et al., 2005; Rodriguez Sinovas et al., 2006). Gewebespezifisch wird Connexinen auch eine Funktion als Tumorsuppressoren zugeschrieben (Temme et al., 1997; Zhang et al., 2003).

1.1.3 Regulation der Gap Junction-Kanäle

Die Connexin-Monomere werden am Endoplasmatischen Retikulum („ER“) posttranslational zusammengelagert. Von dort gelangen sie über das trans-Golgi-Netzwerk an den Mikrotubuli entlang zur Zellmembran, wo sie abseits der Gap Junction-Plaques in die Membran integriert werden. Danach bewegen sich die Connexone lateral und fügen sich an die Außenränder

bestehender Plaques an (Lauf et al., 2002; Gaietta et al., 2002; Martin et al., 2004; Segretain et al., 2003).

Es gibt mehrere Faktoren, die den Öffnungs- und Schließmechanismus der Gap Junction-Kanäle beeinflussen. So kann die Verletzung benachbarter Zellen zu einer Erhöhung der zytoplasmatischen Ca^{2+} -Konzentration und dadurch zum Schließen der Kanäle führen (Peracchia 2004). Abhängig von der Connexin-Isoform ist eine Spannungsänderung über die Plasmamembran (van Veen et al., 2001) oder eine Verringerung des pH-Wertes möglich (Wang et al., 1996; Peracchia 2004), die den Verschluss der Kanäle verursachen können. Die Öffnungszustände der Kanäle werden zudem über Phosphorylierungen und Interaktionen mit anderen Proteinen gesteuert. Dies ist am besten für das Cx43 beschrieben und wird genauer in Abschnitt 1.2.3 erläutert.

Die Degradation der Connexine ist ebenfalls ein bedeutender Faktor zur Regulation der Gap Junction-Kanäle. Der Abbau kann durch Phosphorylierungen (Musil et al., 2000) vermittelt werden. Generell besitzen Connexine sehr kurze, nur wenige Stunden umfassende Halbwertszeiten (Saffitz et al., 2000) und können somit über das Verhältnis Synthese/Degradation von den Zellen reguliert werden.

1.2 Cx43 Gap Junction-Kanäle

1.2.1 Regulation der Gap Junction-Kanäle des Cx43

Über verschiedene Mechanismen wird der Öffnungszustand, die Lokalisation und die Halbwertszeit der Gap Junction-Kanäle des Cx43 reguliert. Die Regulation wird vor allem durch das carboxyterminale Ende (C-Terminus) des Cx43 vermittelt (siehe Abb. 1.4).

1.2.2 Interaktion von Cx43 mit anderen Proteinen

Cx43 ist das bestuntersuchte Mitglied der Connexin-Familie. In den letzten Jahren wurden viele direkte Protein-Interaktionspartner entdeckt und beschrieben (siehe Abb. 1.4). Es gelang, eine direkte Interaktion von Cx43 mit mehreren intrazellulären Zelladhäsionskontaktproteinen wie N-cadherin, p120, α -Catenin und β -Catenin (Wei et al., 2005) nachzuweisen. Diese deuten auf eine Koformation und wechselseitige Beeinflussung von Adherens Junctions und Gap Junctions sowie auf eine Beteiligung bei Signaltransduktionsereignissen hin (Ai et al., 2000). Dem α -Catenin könnte dabei noch eine Rolle beim Transport von Cx43 zukommen (Wu et al., 2003). Mit dem Transport der Connexine zur Plasmamembran wird das Protein CIP150 (Connexin interagierendes Protein, 150kDa) in Verbindung gebracht. Ohne eine Interaktion zwischen Cx43 und CIP150 gelangt Cx43 nicht mehr zur Plasmamembran und liegt nur in der P0-Isoform vor (Akiyama et al., 2005). Über die Bindung von Drebrin an den C-Terminus wird eine Verbindung mit dem Aktinzytoskelett

postuliert, welche eine stabilisierende Wirkung auf die Gap Junction-Plaques ausüben kann (Butkevich et al., 2004). Eine Interaktion mit Calveolin 1 und 2 ist im Golgi-Netzwerk und an der Membran zu finden. Sie spricht für eine Rolle bei der Lokalisation von Connexinen in spezialisierten Plasmamembranbereichen („lipid rafts“) und übt einen Einfluss auf die Gap Junction-Kommunikation („GJC“) aus (Langlois et al., 2007).

Mehrere verschiedene Kinasen interagieren mit Cx43 und haben dabei unterschiedliche Auswirkungen auf die GJC. So können Erk1/2 und 5 („Extrazellulär regulierte Kinasen“) Cx43 phosphorylieren, womit sie einen reduzierenden Effekt auf die GJC haben (Herve et al., 2004; Abdelmohsen et al., 2005). Die Proteinkinase C („PKC“) verringert die Permeabilität der Pore für hydrophile Substanzen (Bao et al., 2007). Die MAPK („Membran assoziierte Proteinkinase“) sorgt über die Phosphorylierung von Cx43 für eine Herrunterregulierung der GJC und agiert stromabwärts von Src (Shen et al., 2007). Im ischämischen Herzen wirkt MKP-1 („MAPK-Phosphatase-1“) als Antagonist zu MAPK und dephosphoryliert Cx43. Die genaue Funktion ist noch nicht geklärt (Li et al., 2005).

Die Tyrosinkinase Src ist an vielen Prozessen beteiligt (siehe 1.2.3). Aktives Src kann als Antagonist zu ZO-1 fungieren und führt durch eine Phosphorylierung des Cx43 (siehe 1.2.2.1) zum Verschluss von Gap Junction-Kanälen. Eine Bindung von c-Src an die SH2-Domäne (Tyrosin 265) und die damit verbundene Phosphorylierung (Toyofuku et al., 2001) verhindert eine Bindung von ZO-1 („Zonula Occludens Protein-1“) (Sorgen et al., 2004). Es wurde gezeigt, dass Src mit Cas („Crk assoziiertes Substrat“) einen Komplex bildet, bevor es Cx43 phosphorylieren kann, wodurch es die Tumorsupressorfunktion von Cx43 aufhebt (Shen et al., 2007). Die erste katalytische Domäne von RPTP μ („receptor protein tyrosine phosphatase μ “) bindet an den C-Terminus von Cx43 und behindert dadurch die Bindung von c-Src (Giepmans et al., 2003).

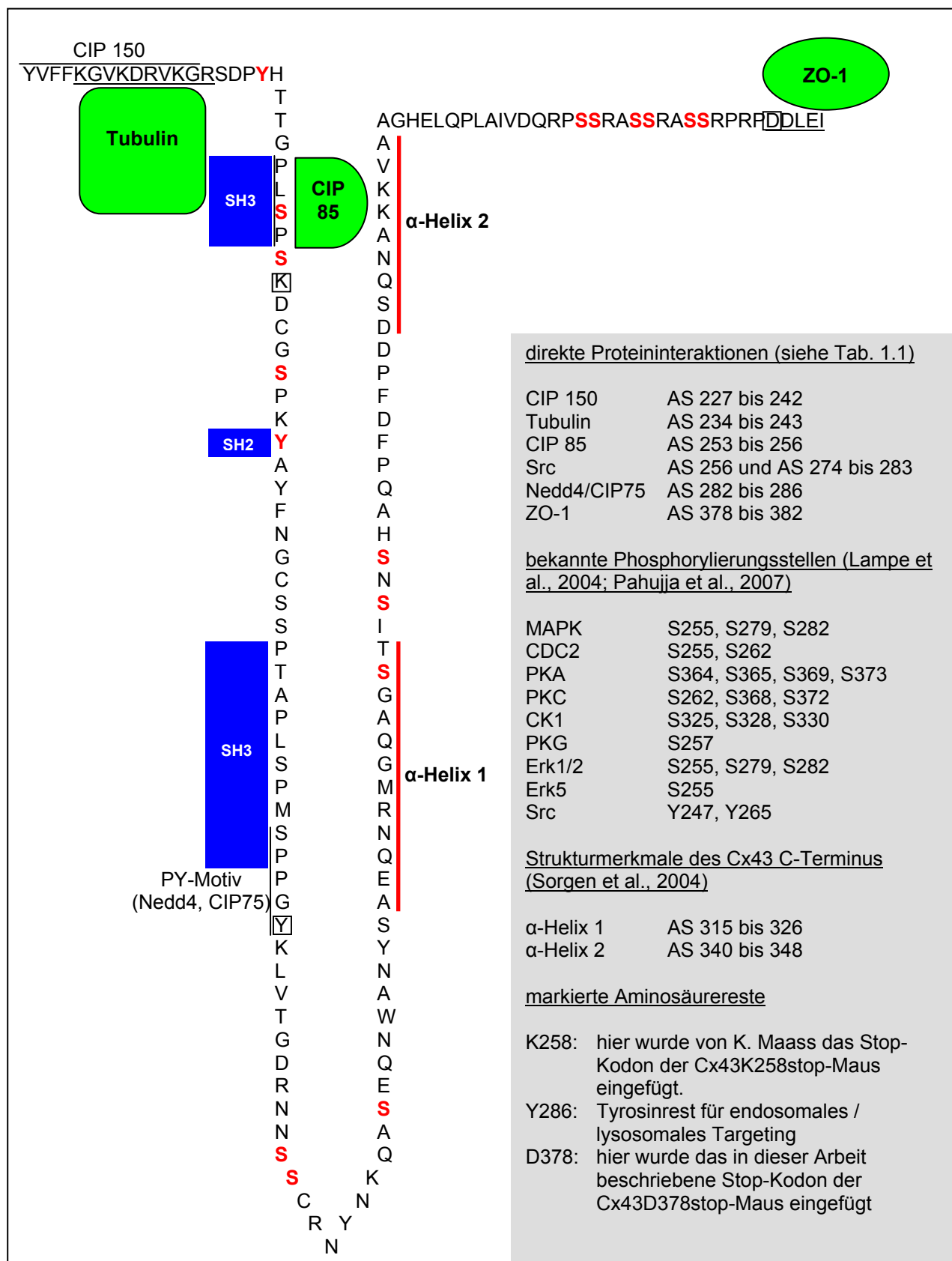
Mit der Beschreibung einer Calmodulinbindestelle (AS 136 bis 158) in der zytoplasmatischen Schleife ist die molekulare Basis für die Inhibition der GJC (siehe 1.1.3) durch Ca^{2+} entdeckt worden (Zhou et al., 2007). Die zytoplasmatische Schleife selbst ist ein Interaktionspartner des C-Terminus. So konnte gezeigt werden, dass bei einer Verringerung des pH-Wertes der C-Terminus an die Schleife bindet, was zu einem Verschluss des Kanals führt („Ball und Kette-Modell“) (Duffy et al., 2002). Der Abbau von Cx43 kann über den lysosomalen und den proteasomalen Weg verlaufen. Es wurden bisher zwei Proteine beschrieben, die an das PY-Motiv (AS 282 bis 286) binden: die Ubiquitin-Proteinligase Nedd4, die für die Internalisierung der Connexine wichtig ist (Leykauf et al., 2006) und das Mitglied der Ubl/UBA- („Ubiquitin-like/Ubiquitin associated“) Familie CIP75 („Connexin interagierendes Protein“, 75kDa), das am ER an Cx43 und das Proteasom bindet und somit den Abbau von Cx43 vermittelt (Li et al., 2007).

Interaktionspartner	Ort der Interaktion	Referenz
α -Catenin	Cx43	Fujimoto et al., 1997
β -Catenin	Cx43	Ai et al., 2000
α/β -Tubulin	AS 234 – 243	Giepmans et al., 2001
Calmodulin	AS 136 – 158	Zhou et al., 2007
Caveolin 1 und 2	Cx43	Langlois et al., 2007
CCN3/NOV	Cx43	Fu et al., 2004
CDC2	AS 255, 262	Pahujaa et al., 2007
CK1	AS 325, 328, 330	Pahujaa et al., 2007
CIP75	AS 282 – 286	Li et al., 2007
CIP85	AS 253 – 256	Lan et al., 2005
CIP150	AS 227 – 242	Akiyama et al., 2005
Drebrin	CT-Terminus	Butkevich et al., 2005
Erk1/2	AS 255, 279, 282	Giepmans 2006
Erk5	AS 255	Abdelmohsen et al., 2005
MAPK	AS 255, 279, 282	Pahujaa et al., 2007
MKP-1	Cx43	Li et al., 2005
N-Cadherin	Cx43	Wei et al., 2005
Nedd4	AS 282 – 268	Leykauf et al., 2006
p120	Cx43	Wei et al., 2005
PKG	AS 257	Kwak et al., 1995
PKA	AS 364, 365, 369, 373	Yogo et al., 2002
PKC	AS 262, 368, 372	Pahujaa et al., 2007
RPTP μ	AS 265	Giepmans et al., 2003
Src	AS 247, 265, 274 – 283	Giepmans 2006
ZO-1	AS 378/379 - 382	Giepmans et al., 1998 Toyofuku et al., 1998 Barker et al., 2002
ZO-2	C-Terminus	Singh et al., 2005

Tab. 1.1: Übersicht über alle bekannten Interaktionspartner des Cx43

Der nicht mit GJC assoziierte Prozess der Proliferationshemmung wird durch die Bindung von Cx43 an das sekretierte CCN3/NOV („Cyr61/connective tissue growth factor-3/nephroblastoma overexpressed“) vermittelt (Fu et al., 2004; Gellhaus et al., 2004). Eine Übersicht

über alle bekannten Interaktionspartner ist in Tab. 1.1 zu finden. Einige Interaktionspartner werden im Folgenden detailliert beschrieben (siehe Abb. 1.6).



1.2.2.1 Interaktion des Cx43 mit dem Zonula Occludens Protein-1 („ZO-1“)

Das Zonula Occludens Protein-1 interagiert mit Cx43 über seine zweite PDZ-Domäne („PSD95 [„postsynaptisches Dichteprotein 95“], disc large, zonula occludens“) mit den letzten Aminosäureresten des C-Terminus von Cx43 (Giepmans et al., 1998; Toyofuku et al., 1998) (siehe Abb.1.6 und 1.7). Es gibt verschiedene Angaben darüber, aus wie vielen Aminosäureresten die ZO-1-Bindestelle besteht: aus den letzten fünf (DDLEI; Barker et al., 2002), den letzten vier (DLEI; Giepmans et al., 1998; Toyofuku et al., 1998) oder sogar nur aus dem letzten Aminosäurerest (I; Toyofuku et al., 1998). Wie diese Bindung zwischen ZO-1 und Cx43 genau aussieht, wurde von Chen et. al. (2008) publiziert. Sie konnten zeigen, dass die Bindung der PDZ2-Domäne an die letzten 12 Aminosäurereste des Cx43 spezifisch ist. So binden die letzten drei Aminosäurereste von Cx43 an die α B/ β B-Grube und die anderen Aminosäurereste an die symmetrischen Taschen der PDZ2-Domäne des ZO-1, die als Dimer vorliegt und zwei Bindestellen für Cx43 aufweist. Durch die Dimerisierung der PDZ2-Domänen wird die Affinität für das Cx43 stark erhöht. Dies könnte zur Stabilisierung und zur Unterstützung des Aufbaus von Connexonen führen, was durch die Möglichkeit der SH3/GUK-Dimerbildung noch verstärkt wird (Chen et al., 2008) (siehe Abb. 1.5). Wurde das Lysin 209 im ZO-1 gegen Alanin ausgetauscht, war keine Interaktion mehr nachzuweisen. Sind die Serine 372 und/oder 373 des Cx43 phosphoryliert, nimmt die Bindungsaffinität stark ab. Dies könnte einen molekularen Schalter darstellen, über den die Bindung von ZO-1 und Cx43 gesteuert wird (Chen et al., 2008). Durch Ko-Immunpräzipitationen konnte gezeigt werden, dass im Herzen eine ZO-1-Bindung an Cx43 vorhanden ist, wenn der C-Terminus ablatiert wurde (Maass et al., 2007). Ob es sich um eine weitere PDZ-unabhängige Bindestelle oder um eine indirekte Bindung handelt, ist zu diesem Zeitpunkt offen (Maass et al., 2007; Severs 2007). Zudem konnte gezeigt werden, dass die Proline 375 und 377 entscheidend für die ZO-1-Bindung sind. Wurden sie gegen andere Aminosäurereste ausgetauscht, konnte keine Interaktion mehr nachgewiesen werden (Sosinsky et al., 2007). Bei ZO-1 handelt es sich um ein so genanntes Gerüstprotein („scaffold protein“), das mit vielen verschiedenen Proteinen interagiert (genauere Beschreibung siehe Abschnitt 1.4). So verbindet ZO-1 das Cx43 mit dem Aktinzytoskelett und mit α -Spectrin (Toyofuku et al., 1998;

Abb. 1.4: Carboxyterminale Domäne des Cx43-Proteins der Maus. Dargestellt ist die Carboxyterminale Domäne des Cx43, in Rot sind alle bisher beschriebenen 17 Phosphorylierungsstellen dargestellt, die entsprechenden Kinasen sind in der Tabelle aufgelistet. Die beiden α -Helices sind als rote Balken dargestellt. In Grün sind die drei in dieser Arbeit genauer untersuchten Interaktionspartner eingezeichnet, sowie alle Interaktionspartner, von denen die genaue Bindedomäne bekannt ist. Dazu zählen die SH2 und SH3 Domäne von c-Src (in Blau).

Gourdie et al., 2006). ZO-1 hat zudem einen Einfluss auf die GJC, da es einen Komplex mit Cx43 und dem PLC β 3-Rezeptor („Phospholipase C β 3“) bildet und über PIP $_2$ („Phosphatidylinositol 4,5-BisPhosphat“) die Phosphorylierung von Cx43 reguliert (Zeijl et al., 2007). Untersuchungen legen nahe, dass eine Interaktion abhängig vom Zellzyklus ist. Es wurde nachgewiesen, dass auch ZO-2 an Cx43 bindet. ZO-1 bindet in der G0-Phase, ZO-2 dagegen vor allem in der S- und der frühen G0-Phase des Zellzyklus (Singh et al., 2005). Die Bindung von ZO-2 und Cx43 über die PDZ2-Domäne ist im Vergleich zur Bindung von ZO-1 und Cx43 allerdings sehr schwach (Chen et al., 2008).

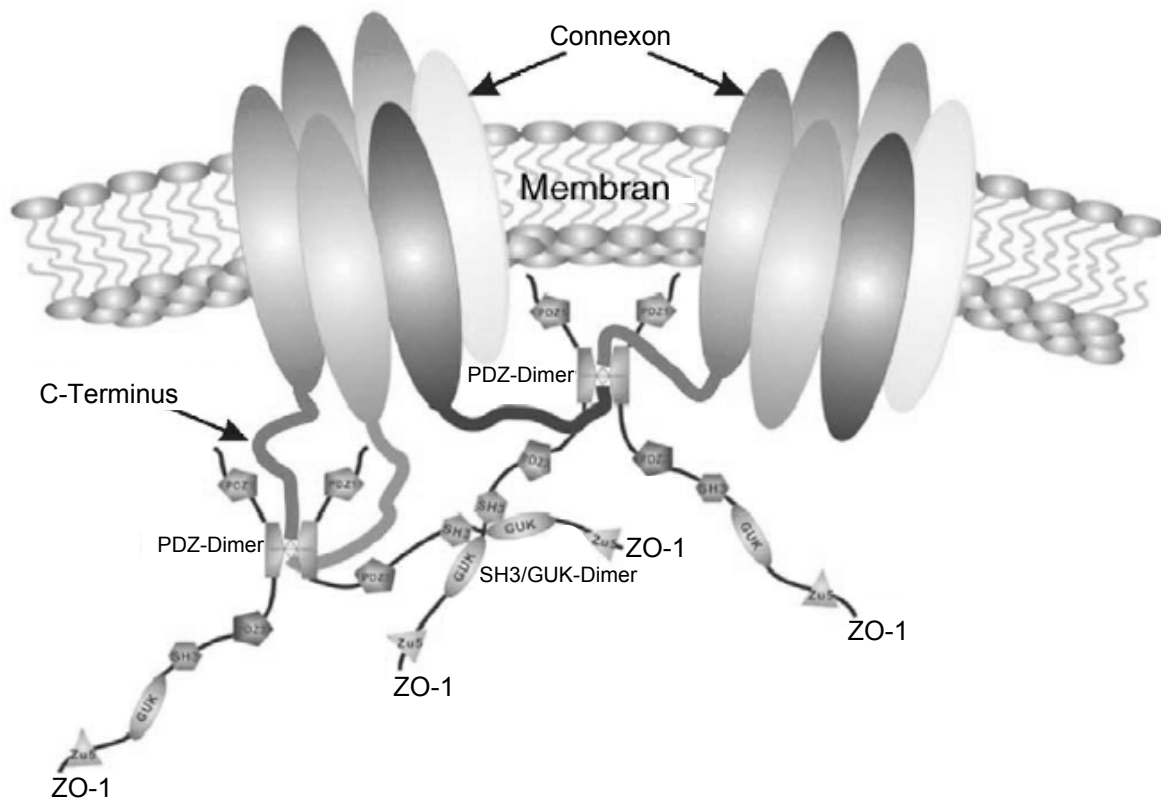


Abb. 1.5: Darstellung der Bindung dimerisierter ZO-1-Proteine mit den C-Termini des Cx43. Durch die PDZ-Dimere ist die Affinität zum C-Terminus des Cx43 erhöht. Durch die Bindung von ZO-1 und Cx43 kann eine erhöhte Stabilität der Lage der Connexone erreicht werden. Zusätzliche Dimerbildungen über die SH3/GUK-Domänen von ZO-1 könnten diese Eigenschaft noch verstärken (verändert nach Chen et al., 2008).

Die Funktion der ZO-1-Interaktion mit Cx43 ist noch nicht vollständig geklärt, aber es gibt Hinweise auf verschiedene Mechanismen. So könnte ZO-1 eine Rolle als „Gatekeeper“ zukommen, da es sich hauptsächlich an der Peripherie der Gap Junction-Plaques befindet und einen Einfluss auf die Anzahl der Cx43-Halbkanäle, die in den Plaque eingebaut werden, ausübt (Hunter et al., 2005; Gourdie et al., 2006). Bisher wurde die Interaktion am genauesten an den Glanzstreifen des Herzens beschrieben, wobei diese direkt nach der Endozytose der Connexine stark zunimmt; an der Membran ist sie eher gering (Barker et al.,

2002). Vor allem die P2-Isoform von Cx43 interagiert mit ZO-1 (Maass et al., 2007; Segretain et al., 2004), wobei noch unklar ist, ob diese Phosphorylierung einen direkten Einfluss auf die Interaktion hat, also als Internalisierungssignal wirkt (Barker et al., 2002). Der schon unter 1.2.2 erwähnte Antagonist von ZO-1 ist c-Src – die Bindung eines der beiden Proteine an Cx43 behindert eine Bindung des jeweils anderen. Es wurde gezeigt, dass die Bindung von ZO-1 an Cx43 die letzten 19 Aminosäurereste des C-Terminus strukturell beeinflusst und dadurch eine Bindung des c-Src sterisch behindert (Sorgen et al., 2004). Der pH-Wert scheint *in vitro* ebenfalls eine Auswirkung auf die Interaktionspartner zu haben: c-Src bindet erst bei einem niedrigen pH-Wert an Cx43, ZO-1 bei einem höheren. Durch die pH-Wertveränderung könnte auch die Internalisierung der Gap Junctions ausgelöst werden (Duffy et al., 2004).

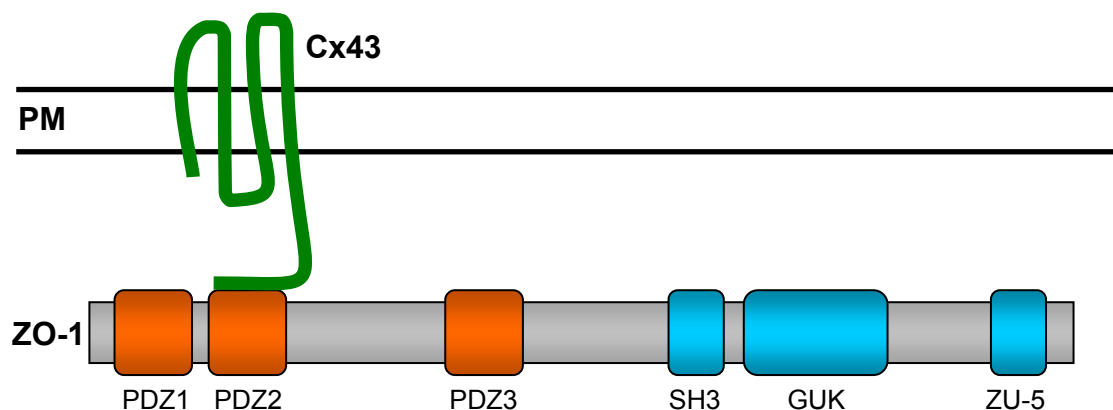


Abb. 1.6: Schematische Darstellung der Interaktion von Cx43 und der zweiten PDZ-Domäne von ZO-1. In Rot sind die drei PDZ-Domänen von ZO-1 zu erkennen, dazu noch eine SH3-, eine GUK- und eine ZU-5-Domäne im C-Terminus (genauere Beschreibung siehe Abschnitt 1.4) (modifiziert nach Zeijl et al. 2007).

Das Proteasom selbst scheint einen Einfluss auf die ZO-1/Cx43-Interaktion zu haben. Wurden die Proteasomen inhibiert, schwächte sich die Interaktion ab und die Größe der Plaques in der Membran nahm zu (Girao et al., 2007). Es wird angenommen, dass das Proteasom einen mutmaßlichen Interaktionspartner des Cx43 abbaut und somit die Größe von Gap Junction-Plaques reguliert. In Experimenten konnte gezeigt werden, dass die Inhibition der Interaktion zwischen ZO-1 und Cx43 (Deletion, siRNS, Inhibitoren) keinen Einfluss auf die Bildung der Cx43-Plaques hat, dafür aber auf die Menge, die Lage, die Größe und die Form der Plaques (Maass et al., 2004 und 2007; Hunter et al., 2005; Bruce et al., 2008). ZO-1 scheint die Größe der Plaques zu bestimmen – und zwar durch die Menge an Cx43, die entweder in die Plaques gelangt oder aus ihnen entfernt wird.

1.2.2.2 Interaktion des Cx43 mit α/β -Tubulin

Die α - und β -Untereinheiten von Tubulin bilden Dimere aus, die auch mit Cx43 interagieren können (siehe Abb. 1.7). Die eigentliche Tubulin-Bindedomäne liegt kurz hinter der letzten Transmembrandomäne (AS 234 bis 243: KGVKDRVKGR) und verbindet das Mikrotubulizytoskelett mit den Gap Junctions. Dies soll einer gegenseitigen Stabilisierung dienen (Giepmans et al., 2001). Es gibt Versuche, die zeigen, dass ohne diese Domäne kein Cx43 zur Membran gelangt (Segretain et al., 2004). Allerdings gibt es Hinweise, dass nicht alle 10 Aminosäurereste benötigt werden, um Cx43 an Mikrotubuli-Plusenden entlang zu transportieren (Shaw et al., 2007). Es scheinen auch die AS 234 bis 238 dafür auszureichen (Nambara et al., 2007). Auf die GJC hat die Bindung von Tubulin keine Auswirkung. Welche Rolle in diesem Zusammenhang das bereits erwähnte CIP150 spielt (Akiyama et al., 2005), bleibt offen, da es fast die gleiche Bindedomäne wie Tubulin besitzt und anscheinend für den Transport essentiell ist. Um die Bindung an Mikrotubuli konkurriert Cx43 mit dem Smad2/3-Komplex, der durch eine Interaktion zwischen Tubulin und Cx43 frei wird, in den Zellkern gelangt und die Transkription mehrerer Wachstumsfaktoren auslöst (Dai et al., 2007).

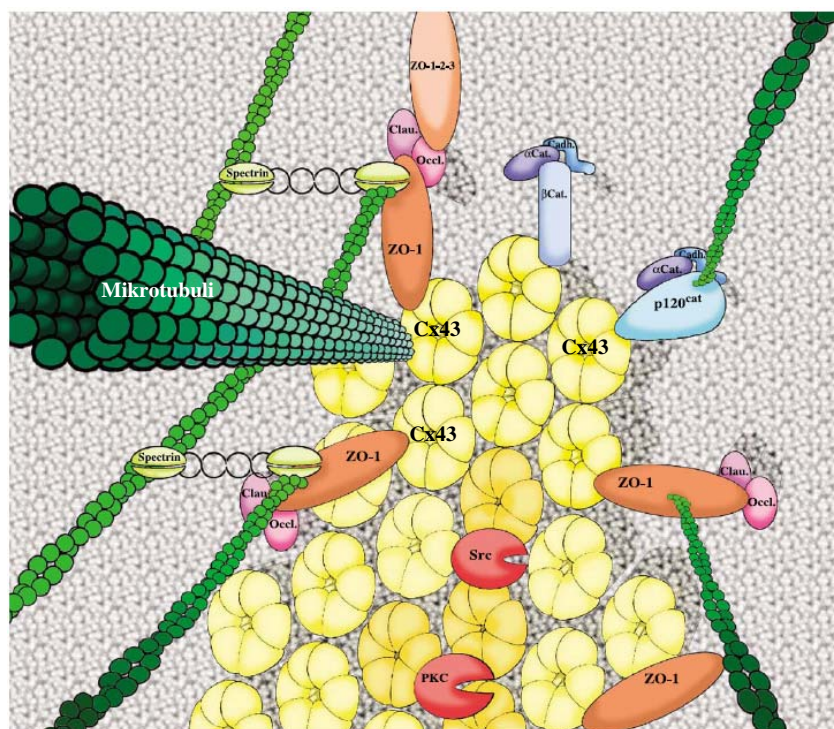


Abb. 1.7: Schematische Darstellung eines Gap Junction-Plaques. Es sind mehrere bekannte Interaktionspartner von Cx43 (z.B. ZO-1, Src und Tubulin) und die jeweiligen bisher bekannten Interaktionskomplexe (ZO-1, Spectrin und Aktin) dargestellt (geändert nach Herve et al., 2004).

1.2.2.3 Interaktion des Cx43 mit CIP85

Vor einiger Zeit wurde das CIP85-Protein („Connexin interagierendes Protein, 85 kDa“) als Interaktionspartner von Cx43 in HEK- und HeLa-Zellen beschrieben. Es handelt sich um ein Rab-GAP-ähnliches Protein mit einer molekularen Masse von 85kDa, das sich aus 750 Aminosäurereste zusammensetzt. Es besitzt eine TBC-, eine SH3- und eine RUN-Domäne, dazu noch eine kurze „coiled coil“-Region. Über die SH3-Domäne bindet es an die AS 253 bis 256 (PLSP) des Cx43 (siehe Abb. 1.8). Neben Ablationen der SH3-Domäne des CIP85 gab es auch Mutationen, in denen die beiden Proline des Cx43 in Alanine umgewandelt wurden. Beide Experimente führten zu einem Verlust der Interaktion, wodurch sich der Anteil von Cx43 an der Membran erhöhte. Es scheint, dass CIP85 den Abbau von Cx43 über den lysosomalen Abbau induziert (Lan et al., 2005).

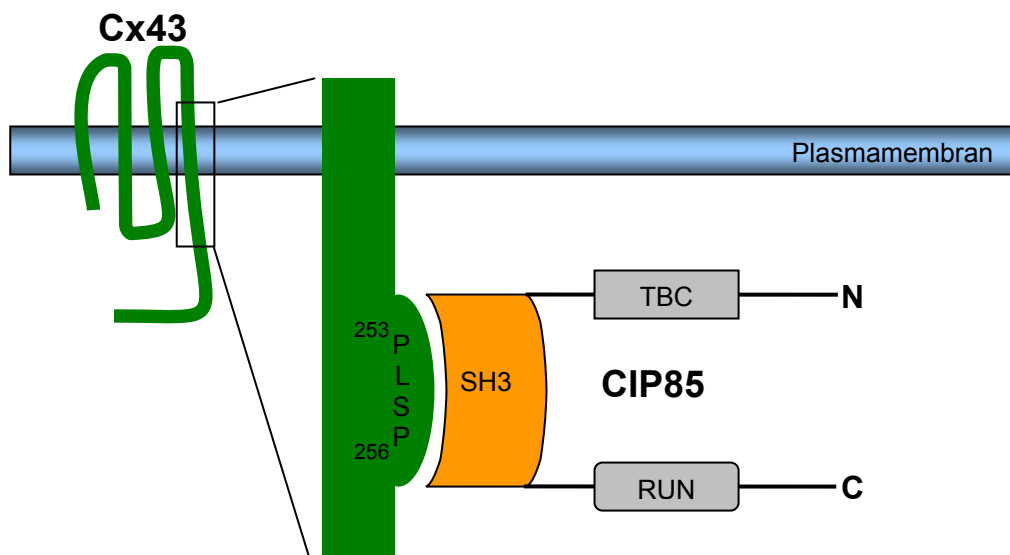


Abb. 1.8: Schematische Darstellung der Interaktion von CIP85 über die SH3-Domäne an die Aminosäurereste PLSP (253 bis 256) im C-Terminus von Cx43.

1.2.3 Regulation des Cx43 durch Phosphorylierung

Wie in Abb. 1.4 dargestellt, sind bisher 17 Phosphorylierungsstellen im C-Terminus von Cx43 beschrieben worden (Axelsen et al., 2006). Die verschiedenen Cx43-Isoformen (P0 bis P2) gehen auf Phosphorylierungen unterschiedlicher Serine zurück. Die P1-Isoform entsteht durch die Phosphorylierung der S364 und S365 durch die PKA („Proteinkinase A“), die P2-Isoform durch die Phosphorylierung der S325, S328 und S330 durch CK1 („Casein Kinase 1“) (Solan et al., 2007). Dabei werden verschiedenen Phosphorylierungen unterschiedliche Funktionen bei der Regulation der Gap Junction-Kanäle zugeschrieben. So gibt es mehrere Kinasen, die Cx43 phosphorylieren und dadurch den Öffnungszustand der Kanäle beeinflussen (Kim et al., 1999; Lampe et al., 2000; Pahuja et al., 2007). Eine Übersicht über Kinasen, die ein Öffnen bzw. Schließen der Kanalporen verursachen, gibt Tab. 1.2.

phosphorylierter Aminosäurerest	Kinase
Phosphorylierungen, welche die GJC senken:	
Y247	Src
S255	MAPK, CDC2
S262	CDC2
Y265	Src
S279	MAPK
S282	MAPK
S368	PKC
S372	PKC
Phosphorylierungen, welche die GJC erhöhen:	
S325	CK1
S328	CK1
S330	CK1
S364	PKA
S365	PKA
S369	PKA
S373	PKA

Tab. 1.2: Cx43-Phosphorylierungen, die einen Einfluss auf die Gap Junction-Kommunikation haben.

Den größten Einfluss auf die GJC übt die Src-Kinase aus, denn sie beeinflusst eine Vielzahl von Kinasen auf unterschiedlichste Art und Weise. Aktiviertes Src führt zur Expression von PDGFR („Proteintyrosinkinase-rezeptor“), welches die MAPK aktiviert. Allerdings kann Src die MAPK selbst aktivieren, indem es Komplexe mit Ras bildet. Durch die Phosphorylierung der PKC durch Src wird diese aktiviert, zudem ist eine Autophosphorylierung von Src möglich. CDC2 („cell division cycle 2“) phosphoryliert Src und aktiviert es damit. All diese Interaktionen führen zu einer Herunterregulierung der GJC. Die Phosphorylierung von Cx43 durch PKA hemmt die Src-Funktion und führt somit zu einer Erhöhung der GJC (Pahujaa et al., 2007). Weiterhin konnte gezeigt werden, dass eine Phosphorylierung von Cx43 durch Erk1/2 und Erk5 einen negativen Einfluss auf die GJC hat (Abdelmohsen et al., 2005). Das antagonistische Verhalten von Src und ZO-1 wurde bereits unter 1.2.2.1 genauer beschrieben. In Kardiomyozyten führt eine Phosphorylierung von Cx43 durch Src und PKC zur DNS-Synthese und somit zur Mitose (Doble et al., 2004). Durch Phosphorylierungen kommt es zu Konformationsänderungen am C-Terminus des Cx43; es müssen allerdings alle sechs Untereinheiten eines Connexons phosphoryliert sein, damit sich die Wirkung auf die GJC einstellen kann (Bao et al., 2004a und b). Die kurze Halbwertszeit des Cx43 von 2 bis 6 Stunden (Saffitz et al., 2000) bildet ebenfalls einen Mechanismus der Regulation der Gap Junction-Kanäle. So bindet ZO-1 bei der Endozytose des Cx43 vor allem an die P2-Isoform (Segretain et al., 2004), die Ubiquitin-Proteinligase Nedd4 bindet nur an phosphoryliertes Cx43 und führt dann zur Internalisierung (Leykauf et al., 2006). Wird das Abbausignalmotiv

Tyrosin 286 gegen Phenylalanin ausgetauscht, behindert es den endosomale/lysosomale Abbauweg, wodurch sich die Halbwertszeit des Cx43 verlängert (Thomas et al., 2003). Gap Junction-Kanäle werden sowohl als Vollkanäle (annuläre Gap Junctions) als auch als Halbkanäle endozytiert (Saffitz et al., 2000; Segretain et al., 2004). Am Abbau der Gap Junction-Kanäle des Cx43 sind sowohl das lysosomale als auch das proteasomale System beteiligt (Laing et al., 1998; Segretain et al., 2004; Lan et al., 2005; Girao et al., 2007).

1.2.4 Regulation der GJC über den intramolekularen „Ball und Kette“-Mechanismus

Es ist bekannt, dass ein Abfall des extra- und intrazellulären pH-Wertes unter pathologischen Umständen aufgrund einer Sauerstoffunterversorgung (Hypoxie) auftreten kann. Dies wird durch die fehlende bzw. unzureichende arterielle Blutzufuhr (Ischämie) des Gewebes verursacht. Unter diesen Bedingungen schließen sich die Gap Junction-Kanäle sehr schnell, wobei die jeweilige pH-Wert-Sensibilität von der Zusammensetzung des Halbkanals abhängig ist (Spray et al., 1990; Francis et al., 1999). Bei Experimenten mit verkürzten Cx43-Proteinen wurde nachgewiesen, dass das Schließen der Kanalpore sowohl vom pH-Wert als auch von der Länge des C-Terminus abhängig ist (Liu et al., 1993). Durch die Koexpression verkürzter Cx43-Proteine und dem C-Terminus des Cx43 konnte der Verschlussmechanismus wiederhergestellt werden. Auf Basis dieser Ergebnisse wurde das intrazelluläre „Ball und Kette“-Modell entwickelt (Morley et al., 1996; Delmar et al., 2004). Hierbei dient ein Teil des C-Terminus als „Ball“, der beim Abfallen des intrazellulären pH-Wertes die Kanalpore schließt (Duffy et al., 2001) (siehe Abb. 1.9). An die Rezeptordomäne, die aus den Aminosäureresten 100 bis 155 (Hirst-Jensen et al., 2006) oder 119 bis 144 (Duffy et al., 2002) in der intrazellulären Schleife besteht, binden die Aminosäurereste 343 bis 346 und 376 bis 379 des C-Terminus von Cx43 am stärksten, die Aminosäuresequenzen 312 bis 332, 335 bis 340, 347 bis 349, 357 bis 361, 364 bis 374 und 380 bis 382 nur schwach (Hirst-Jensen et al., 2006). Es wurde gezeigt, dass sich bei einem niedrigen pH-Wert die Struktur der intrazellulären Schleife in eine α -Helix umwandelt, während es im C-Terminus kaum Änderungen gibt (Duffy et al., 2002). Wenn die Interaktion zwischen C-Terminus und Schleife durch sterische Peptide behindert wurde, blieben die Kanäle länger offen und schlossen nicht so schnell, was mit den Ergebnissen verkürzter Cx43-Proteine übereinstimmt (Seki et al., 2004). So wurde bei HeLa-Zellen, die das Cx43 mit der Mutation Cx43K258stop exprimieren, beobachtet, dass die Kanäle die meiste Zeit offen und nur selten geschlossen sind, der Ruhezustand wurde gar nicht mehr erreicht (Seki et al., 2004; Maass et al., 2007). Der Teil des C-Terminus, der nicht an den Rezeptor bindet, dient als „Kette“ (Ek-Viktorin et al., 1996; Calero et al., 1998). Da Monomere beim Absinken des pH-Wertes an den Aminosäureresten 364 bis 382 dimerisieren, scheint es sich um einen kooperativen

Prozess mehrerer Cx43-Untereinheiten zu handeln (Delmar et al., 2004; Hirst-Jensen et al., 2006; Sorgen et al., 2004).

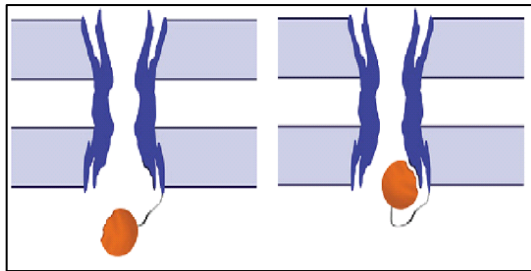


Abb. 1.9: Darstellung des „Ball und Kette“-Modells. Bei normalen Bedingungen ist der „Ball“ (orange) von der Kanalpore entfernt. Sinkt der pH-Wert, bindet der „Ball“ an den Rezeptor (intradomänäre Schleife) an der Pore und verschließt den Kanal (verändert nach Delmar et al., 2004).

Nicht nur Veränderungen des pH-Wertes führen zu einem Verschluss von Cx43-Kanälen durch den „Ball und Kette“-Mechanismus. *In vitro* wurde experimentell nachgewiesen, dass eine Stimulation durch Insulin/IGF („Insulin growth factor“) (Homma et al., 1998) oder PDGF (Moorby et al., 1999) zum Schließen der Kanäle führt. Gleiches wird durch eine erhöhte Potenzialdifferenz zwischen benachbarten Zellen bewirkt (Moreno et al., 2002). Für die Src-Kinase, die daraus resultierende Phosphorylierung und die Schließung der Kanäle scheint ebenfalls das „Ball und Kette“-Modell zuzutreffen. Denn auch hier beeinflusst ein niedriger pH-Wert bei Cx43 die Interaktion mit ZO-1 und die Bindung von Src (Zhou et al., 1999; Duffy et al., 2004).

1.2.5 Regulation des Cx43 durch eine veränderte cAMP- und Kalzium-Konzentration

Wenn intrazellulär die cAMP-Konzentration zunimmt kommt es durch einen verstärkten Transport von neuen Cx43-Halbkanälen zur Membran zu einer erhöhten Cx43-vermittelten GJC (Darrow et al., 1995). Abhängig ist dieser Transport von der Phosphorylierung des Serins 364 des Cx43 durch die PKA (Paulson et al., 2000, Solan et al., 2005). Eine Erhöhung der intrazellulären Kalzium-Konzentration führt dagegen durch die Phosphorylierung über die PKC zu einer Erniedrigung der Kommunikation durch die Cx43-Kanäle (Doble et al., 2000, Pahuja et al., 2007). Die dafür passende Bindestelle für Calmodulin und damit die molekulare Basis für das Schließen der Kanäle wurde in der intrazellulären Schleife beschrieben (siehe 1.2.2) (Zhou et al., 2007). Als Beispiel für die Regulation der durch PKA und PKC vermittelten Phosphorylierungen und damit die Kontrolle über den Öffnungszustand der Cx43-Kanäle kann die embryonale Herzentwicklung dienen, denn hier sind Störungen dieser fein abgestimmten Maschinerie durch eine Fehlentwicklung nachgewiesen (Britz-Cunningham et al., 1995; Duncan et al., 2002).

1.2.6 Regulation der Wachstumskontrolle durch den C-Terminus von Cx43

Dang et al. (2003) postulierten, dass der C-Terminus des Cx43 eine aktive Rolle bei der Proliferationskontrolle von Zellen spielt. Dies wurde am Beispiel von HeLa-Zellen gezeigt. Wurde nur das carboxyterminale Ende von Cx43 exprimiert, hier die Aminosäurereste 243 bis 382, reduzierte sich die Zellproliferation. Es machte keinen Unterschied, ob das gesamte Connexin oder nur der C-Terminus exprimiert wurde (Zhang et al., 2003). Des Weiteren wurde die direkte Interaktion des Cx43 mit CCN3/NOV nachgewiesen (siehe 1.2.2). Diese spielt eine Rolle bei Entwicklung, Differenzierung, Angiogenese, Wundheilung, Migration, Entzündungsprozessen und Tumorwachstum (Brigstock et al., 1999; Fu et al., 2004; Gellhaus et al., 2004). Wurde Cx43 in maligne Zellen (Gellhaus et al., 2004) oder Gliomazellen (Gupta et al., 2001) transfiziert, ging die Proliferationsrate zurück; gleichzeitig kam es zu einer verstärkten Lokalisation von CCN3/NOV an die Membran. Zudem konnte gezeigt werden, dass die GJC nicht entscheidend für die Wachstumskontrolle ist, da Cx43 diese Funktion auch in den Mutationen ausübte, in denen es gar nicht zur Membran gelangt, sondern nur zytoplasmatisch vorliegt (Olbina et al., 2003). In menschlichen Dickdarmkrebsgeweben wurden Mutationen im C-Terminus des Cx43 innerhalb invasiver Tumorstrukturen entdeckt (Dubina et al., 2002). Diese Mutationen konnten bisher nur in späteren Stadien der Tumorphase und nicht in benignen Vorläuferzellen entdeckt werden.

1.2.7 Expression des Cx43 während der Embryonalentwicklung

Während der Embryogenese ist die Expression von Cx43 räumlich wie zeitlich stark reguliert (Ruangvoravat et al., 1992; Sainio et al., 1992; Dahl et al., 1995; Wörsdörfer et al., 2008). So wurde sie in der Zygote und der Blastozyste nachgewiesen (Reuss et al., 1997). Nach der Implantation in der Dezidua ist die Expression von Cx43 auf die embryonalen Zellen beschränkt (Dahl et al., 1996). Das Cx43-Protein und die mRNA von Cx43 wurde während der Gastrulation in Geweben nachgewiesen, die sich aus dem Ektoderm, Mesoderm und Endoderm ableiten, ebenso in Geweben, die sich von Zellen der Neuralleiste ableiten sowie in Organen, die induktive Wechselwirkungen durchlaufen (Ruangvoravat et al., 1992; Dahl et al., 1995; Waldo et al., 1999; Kretz et al., 2006).

1.2.7.1 Embryonale und postnatale Expression von Cx43 im Herzen der Maus

Ab Tag 9,5 der embryonalen Entwicklung wird Cx43 im Ventrikel und ab Tag 12,5 in den Atrien exprimiert. Die Expression erfährt während der weiteren Herzentwicklung eine starke Zunahme (Delorme et al., 1997; Duncan et al., 2002). An der Morphogenese und Trennung des zunächst einheitlichen Ausflusstraktes des Herzens (Conus cordis, Truncus arteriosus) in Aorta und *Truncus pulmonalis* sind Cx43-exprimierende Neuralleistenzellen beteiligt (Huang et al., 1998). Cx43 spielt bei der Ausbildung der atrialen und ventrikulären Septen

eine Rolle (Kirchhoff et al., 2000; Lo 2000). In den Kardiomyozyten ist Cx43 direkt nach der Geburt in allen Membranen lokalisiert und zwar in Form einer Vielzahl kleiner Gap Junction-Plaques. Bereits eine Woche nach Geburt der Maus ist das Cx43 hauptsächlich an den Glanzstreifen und den direkt benachbarten lateralen Membranen zu finden. Erst zwei bis drei Wochen nach der Geburt ist Cx43 nur noch in den Membranen der Glanzstreifen lokalisiert (Manjunath et al., 1984; Fromaget et al., 1992; Angst et al., 1997; Severs et al., 2004; Gourdie et al., 2006). Im adulten Herz der Maus findet sich Cx43 nur im Myokard der Atrien, in den Purkinje-Fasern und im ventrikulären Arbeitsmyokard (Beyer et al., 1987; Gourdie et al., 1993; Coppen et al., 1999), wo es der longitudinalen Reizweiterleitung dient (Peters et al., 1998). Verschiebt sich die Verteilung von Cx43 von den Glanzstreifen an die lateralen Seiten, wie in der Myokardschicht um Infarktnarben, in hyperthrophierten Gewebe oder in der Cx43G138R-Maus, wird dies als Prädisposition für Arrhythmieentstehung durch Veränderung der anisotropen Reizweiterleitung angesehen (Peters et al., 1997; Matsushita et al., 1999; Emdin et al., 2001; Dobrowolski et al., 2008). Auch bei anderen humanen Erkrankungen ist die Verteilung und Menge von Cx43 verändert. So bei Kardiomyopathien, bei Myokarditis und im ischämischen Herzen (Dupont et al., 2001; Kostin et al., 2003; Severs et al., 2004).

1.2.8 Expression von Cx43 in der adulten Maus

Cx43 wird in endothelialen Zellen (Haefliger et al., 2004; Theis et al., 2004) und in der glatten Muskulatur der Gefäße (Haefliger et al., 2004), des Darms (Wang et al., 2001) sowie des Uterus (Mitchell et al., 2001) exprimiert. In Astrozyten (Theis et al., 2003), in Epithelzellen der Augenlinse und Cornea (White et al., 2001), in Keratinozyten des *Stratum basale* und *spinosum* (Kretz et al., 2003) und in den myoepithelialen Milchdrüsenzellen (Plum et al., 2000) ist Cx43 ebenfalls vorhanden. Zusätzlich wurde Cx43 in den Leydig- und Sertoli-Zellen des Hodens (Roscoe et al., 2001), im Ovar, in den reifenden Follikeln, in den Granulosa-Zellen (Gittens et al., 2003), in hämatopoetischen Zellen des Rückenmarks (Oviedo-Orta et al., 2004), im Thymus (Alves et al., 1995), in der Milz (Krenacs et al., 1996), in den Odontoblasten und in den Osteoblasten (Murakami et al., 2001) nachgewiesen.

1.3 Cx43-Mausmutanten

Bisher wurden mehrere Mausmodelle beschrieben, die Veränderungen des *Gja1*-Gens in sich tragen (Gros et al., 2004). Eine Maus mit einer kompletten Deletion des *Gja1*-Gens (Cx43KO) wurde von Reaume et al. (1995) beschrieben. Eine Stenose, die durch die verstärkte Bildung von Tarbeculae carnae im Bereich des Ausflustraktes im rechten Ventrikel verursacht wird, führt zu einer Zyanose, aufgrund derer homozygote Tiere wenige Stunden nach der Geburt sterben. Bei diesen Tieren kommt es während der Embryonalentwicklung

zu einer veränderten Ausbildung der Herzscheife, wodurch der rechte Ventrikel stärker mit dem Herzausflusstrakt verbunden bleibt. Die Trennung vom Kreislauf der Mutter bedingt durch die Behinderung des Blutflusses zur Lunge eine Zyanose (Ya et al., 1998). Dies wird auf eine veränderte Migration Cx43-exprimierender Neuralleistenzellen zurückgeführt (Ewart et al., 1997; Huang et al., 1998). Zusätzlich wurden bei den Cx43KO-Mäusen Entwicklungsstörungen in Atrium und Ventrikel und bei der Septenbildung (Kirchhoff et al., 2000; Lo et al., 2000), eine Veränderung der Koronarterien (Clauss et al., 2006), eine verzögerte Ossifikation von Gesichtsknochen, Rippen und Wirbelsäule (Lecanda et al., 2000), die Bildung von Katarakten in der Linse (Gao et al., 1998), Störungen bei der Spermatogenese (Roscoe et al., 2001) und der Hämatopoese (Montecino-Rodriguez et al., 2000) beschrieben. Die vielen unterschiedlichen Defekte scheinen von der Gendosis abzuhängen (Xie et al., 2005). In heterozygoten Cx43KO-Mäusen ist zwar kein Einfluss auf die Hyperplasie der Gallenwege, aber auf die Angiogenese der Lebervene beschrieben (Teixeira et al., 2007). Pränatal wurde an Herzen homozygoter Cx43KO-Mäuse eine reduzierte ventrikuläre Reizweiterleitung, einhergehend mit einer Cx40-Reduktion festgestellt (Vaidya et al., 2001). Wurde das *Gja1*-Gen spezifisch in Kardiomyozyten deletiert, wird eine verzögerte Reizweiterleitung mit Todesfolge, verursacht durch Arrhythmien im Herzen, innerhalb der ersten zwei Monate nach der Geburt beobachtet (Gutstein et al., 2001). Bei Ausschaltung des Cx43 im Herzen adulter Mäuse starben die Tiere innerhalb von 4 Wochen nach der Induktion (Eckardt et al., 2004) und zeigten sowohl eine Tachykardie als auch eine Reduktion der Reizweiterleitung im Ventrikel. Der Austausch des *Gja1*-Gens durch die Gene für die Cx32- und Cx40-Proteine hob den lethalen Phänotyp auf (Plum et al., 2000). Dagegen kann Cx31 das Cx43 nicht funktionell ersetzen, denn Cx43KICx31-Mäuse besitzen Deformationen des Herzens, ähnlich dem Cx43KO (Zheng-Fischhöfer et al., 2006). In Cx43KICx26-Mäusen wird statt Cx43 das Cx26 exprimiert; diese Tiere besitzen disfunktionale Reproduktionsorgane und die Reizweiterleitung im Ventrikel ist verlangsamt (Winterhager et al., 2007). Das Einbringen der G138R-Mutation in das Cx43-Protein erzeugte ein Tiermodell für die Oculodentodigitale Dysplasie (Dobrowolski et al., 2008). Alle beim Menschen auftretenden phänotypischen Erscheinungen sind auch in der Maus zu finden. Dazu gehören Syndactylie, Zahnschmelzreduktion, craniofaciale, Knochen- und Herz-Anomalien sowie spontane Arrhythmien im Herzen. Dabei wurde auch der Verlust der P2-Isoform von Cx43 festgestellt und eine erhöhte Abgabe von ATP durch Cx43G138R-Halbkanäle. In der Cx43K258stop-Maus wird ein Cx43-Protein mit einer Ablation der letzten 125 Aminosäurereste des C-Terminus von Cx43 exprimiert (Maass et al., 2004; Maass et al., 2007). Homozygote Cx43K258stop-Tiere sterben mit einer Wahrscheinlichkeit von über 97% innerhalb von sechs Tagen nach der Geburt aufgrund einer fehlerhaften Permeabilitätsbarriere der Epidermis, wodurch die Tiere austrocknen. Im Herzen scheint die terminale Differenzierung der

Kardiomyozyten gestört zu sein. Die wenigen adulten Weibchen waren aufgrund einer fehlerhaften Follikelgenese unfruchtbar. Wurden die heterozygoten Tiere mit Mäusen verpaart, bei denen das *Gja1*-Gen auf einem Allel durch ein LacZ-Gen ausgetauscht worden ist, waren die heterozygoten Tiere (*Gja1*del/*Cx43*K258stop) lebensfähig. In den Herzen der Tiere konnte nachgewiesen werden, dass die Cx43-Kanäle geöffnet, die Gap Junction-Plaques allerdings in den Kardiomyozyten zum Teil auch an den lateralen Membranen lokalisiert sowie größer und geringer in der Anzahl waren. Der C-Terminus scheint damit eine wichtige Rolle bei der Regulation der Größe, der Anzahl und der Lokalisation von Cx43 Gap Junction-Plaques zu spielen (Maass et al., 2004; Maass et al., 2007).

1.4 Zonula Occludens-Proteine

Bislang wurden drei verschiedene Zonula Occludens-Proteine beschrieben: das erste war ZO-1 („Zonula occludens-Protein-1“), das gleichzeitig das erste als Bestandteil von Tight Junctions beschriebene Protein war (Stevenson et al., 1986), dann folgte ZO-2 (Gumbiner et al., 1991) und schließlich ZO-3 (Haskins et al., 1998). Alle ZO-Proteine sind in der Membran zu finden. Es sind Gerüstproteine, die mit vielen verschiedenen Proteinen (Zytoskelett-, Transmembran- und Signaltransduktions-Proteinen) interagieren (Anderson et al., 1988). Die Proteine gehören zur MAGUK-Familie („membrane associated guanylate kinase“) und besitzen mehrere spezifische Domänen, darunter drei PDZ- („Postsynaptic Density Protein 95, Disc Large, Zonula Occludens“), eine SH3- („Src-Homologie“) und eine GUK-Domäne („Guanylatkinase“). Zusätzlich besitzt ZO-1 eine alternative Spleißstelle (Giepmans et al., 1998), eine Aktin bindende Region (Fanning et al., 2002) und eine Prolinreiche Region am C-Terminus (Itoh et al., 1997; Giepmans et al., 1998) (siehe Abb. 1.10). Das am besten beschriebene ZO-Protein ist ZO-1. Es besteht aus 1.745 Aminosäuren und hat eine molekulare Masse von 220 kDa; ZO-2 mit 1.167 AS und ZO-3 mit 905 AS sind bedeutend kleiner (Anderson et al., 1988; Adachi et al., 2006).

ZO-1

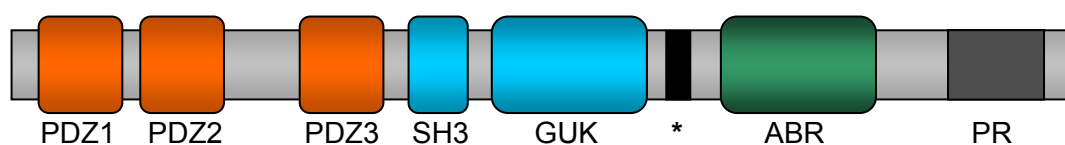


Abb. 1.10: Schematische Darstellung des ZO-1-Proteins mit den bekannten Regionen. Dazu gehören die drei PDZ-, die SH3- und die GUK- Domäne sowie eine ABR („Aktin bindende Region“). Weiterhin ist am C-Terminus eine Prolinreiche Region (PR) beschrieben worden. Mit * ist eine bekannte alternative Spleißstelle bezeichnet.

Die ZO-Proteine sind ein wichtiger Bestandteil der Tight Junctions (TJs). Alle drei Familienmitglieder werden in Epithelien exprimiert, aber nur ZO-1 und -2 auch im Endothel (Adachi et al., 2006). ZO-1-Bindet an viele bekannte Proteine, die Bestandteil der TJs sind; es verbindet das Aktinzytoskelett mit Catenin und Cadherin (Itoh et al., 1993 und 1997) und bindet an Occludin (über GUK), Claudin (über PDZ1) und Bves (Schneeberger et al., 2004; Osler et al., 2005; Fanning et al., 2007). Wird die Bindung zu Aktin verhindert, ist ZO-1 kaum noch an den TJs zu finden (Fanning et al., 2002). Tight Junctions erfüllen in Zellen zwei Aufgaben:

1. Barrierefunktion (verhindert die Diffusion zwischen den Zellen),
2. Zaunfunktion (Asymmetrie der Zellen wird aufrechterhalten, da Lipide und andere Membranbestandteile nicht diffundieren können).

Mehrere Untersuchungen konnten die Bedeutung von ZO-1 bei der Bildung der TJs zeigen. Fehlt ZO-1 bzw. wird dessen SH3-Domäne ausgeschaltet, verzögert sich die Bildung der TJs um bis zu drei Stunden, wobei der strukturelle Aufbau und die Zusammensetzung anscheinend unverändert bleiben (McNeil et al., 2006). So zeigte sich auch in ZO-1-Knock-Out-Zellen eine normale Polarisierung und Bildung von TJs und Adherens Junctions (Umeda et al., 2004). Dabei ließ sich eine Hochregulation von ZO-2 und einer Runterregulation von Cingulin an den TJs beobachten. Wurden dagegen ZO-1 und -2 ausgeschaltet, bildeten sich in Zellkultur keine TJs mehr; die Zellen waren jedoch aber immer noch polarisiert (Umeda et al., 2006). Auch die Beteiligung bei der Bildung von Adherens Junctions (AJs) wurde nachgewiesen, denn ohne ZO-1 findet die Umgestaltung der AJs in Fibroblasten zu polarisierten Epithel-AJs nicht statt (Ikenouchi et al., 2007). Bei der Migration spielt ZO-1 eine Rolle, es ist an der „leading edge“ lokalisiert und somit ein Kandidat für die Initiierung und Organisation der Integrin-abhängigen Adhäsionsbildung ist (Taliana et al., 2005). Dabei wird spekuliert, ob eine Phosphorylierung von ZO-1 dessen zelluläre Lokalisation steuert. Durch die Bindung von ZO-1 an ZONAB („ZO-1 assoziiertes Nukleinsäure bindendes Protein“) übt ZO-1 Einfluss auf die Zellproliferation aus, wobei diese Interaktion von der Zelldichte abhängig zu sein scheint (Balda et al., 2000 und 2003; Schneeberger et al., 2004). Bindet ZONAB an ZO-1, wird dieses im Cytosol zurückgehalten und in seiner transkriptionalen Aktivität inhibiert (Tsapara et al., 2006). Die Bindung von Cx43 und ZO-1 wurde bereits im Abschnitt 1.2.2.1 ausführlich beschrieben. Es gibt Veröffentlichungen, die sowohl eine Lokalisation des ZO-1 im inneren und Cx43 im äußeren Bereich der Connexin-Plaques beschreiben (Bruce et al., 2008) wie auch den umgekehrten Fall (Akoyev et al., 2007). Es wurde gezeigt, dass ZO-1 selbst dann an der Peripherie von Cx43-Plaques lokalisiert ist, wenn die PDZ2-Domäne ablatiert und die Bindung an ZO-2 verhindert wurde (Hunter et al., 2008). Neben Cx43 bindet ZO-1 an eine Reihe weiterer Connexine, dazu gehören Cx31.9 (Nielsen et al., 2002), Cx32 (Kojima et al., 2001), Cx35 (Flores et al., 2008), Cx36 (Li et al., 2004; Lu et al., 2007), Cx45 (Laing et al., 2001), Cx46 (Nielsen et al., 2003), Cx47 (Li et al., 2004) und Cx50 (Nielsen et

al., 2003). ZO-1 bildet über die PDZ2-Domäne Homodimere sowie mit ZO-2 und -3 Heterodimere. ZO-2 bindet dabei nicht an ZO-3 (Adachi et al., 2006; Utepbergenov et al., 2006).

In den letzten Jahren wurden KO-Mäuse für jedes der drei ZO-Proteine beschrieben. ZO-1-Tiere sind im heterozygoten Zustand in ihrer Entwicklung normal und fertil. Dagegen sind homozygote ZO-1-KO-Tiere in Wachstum und in Entwicklung vom Tag E8,5 an verzögert. Ab Tag E9,5 wurde Apoptose in der Allantois und im Notochord nachgewiesen. Die Tiere sterben am Tag E11,5. Im Dottersack gibt es schwere Defekte in der vaskulären Entwicklung und bei der Bildung der Vaskulärbäume. Ein Einfluss auf ZO-2 und -3 konnte nicht nachgewiesen werden, ebenso ist die Differenzierung der Endothelzellen nicht betroffen. Im Mesoderm außerhalb des Embryos wurden aufgrund der ZO-1-Deletion und dem Fehlen von ZO-2 und -3 die Proteine der AJs falsch lokalisiert. ZO-1 hat damit einen Einfluss auf die Umwandlung von Zellen und auf die Gewebeorganisation inner- wie außerhalb des Embryos. (Katsuno et al., 2008). Es wurde gezeigt, dass ZO-1 erstmals im 8-Zellstadium exprimiert wird und eine Rolle beim Übergang von der Morula zur Blastozyste spielt. Wurde ZO-1 mittels siRNS herunterreguliert, fand dieser Übergang nicht mehr statt. ZO-1 hat eine demnach wichtige Aufgabe bei der Differenzierung von unpolaren Blastomeren zu polaren Trophoblasten. Die Proteine Cdx2 und Oct4 werden herunterreguliert und die Proteine F-Aktin und ZO-2 nicht beeinflusst (Wang et al., 2008).

Durch einen Arrest der Gastrulation sterben ZO-2KO-Mäuse kurz nach dem Einnisten der Blastozyste in die Gebärmutter. Ab Tag E6,5 ist nur noch eine geringe Proliferation und ab Tag E7,5 eine erhöhte Apoptose nachweisbar. Dabei ist die Permeabilität zwischen den Zellen beeinträchtigt und die Architektur des apikalen junctionalen Komplexes zerstört (Xu et al., 2008). Bei ZO-3KO-Mäuse trat bisher kein auffälliger Phänotyp auf (Xu et al., 2008). Mit Hilfe dieser KO-Mäuse konnte gezeigt werden, dass die ZO-Proteine nicht redundant sind.

1.5 Erzeugung transgener Mäuse und die Verwendung von eGFP als Reportergen

Transgene Tiere werden häufig eingesetzt, um die funktionelle Bedeutung eines Gens oder bestimmter Abschnitte eines Gens *in vivo* zu untersuchen. Dabei wird die kodierende Region des entsprechenden Gens entfernt, durch ein Reportergen oder eine gezielt veränderte Sequenz ausgetauscht (Bradley et al., 1998; Shashikant et al., 2003). Die Erzeugung der Tiere erfolgt durch eine Injektion veränderter embryonaler Stammzellen, die auch unter Kulturbedingungen *in vitro* ihre Totipotenz behalten (Williams et al., 1988; Hilton et al., 1991), in Blastozysten (Nagy et al., 2003). Im Folgenden wird die Erzeugung transgener Mäuse durch homologe Rekombination in ES-Zellen genauer beschrieben.

1.5.1 Erzeugung transgener Mäuse durch homologe Rekombination

In vitro wird das gewünschte Gen gezielt durch homologe Rekombination mit einem dafür extra angefertigten Knock-In-Vektor ausgetauscht (Nagy et al., 2003). Dabei kommt es zum doppelten Überkreuzen („crossing over“) zwischen den flankierenden homologen Bereichen des Austauschvektors mit den homologen Bereichen in der Zielsequenz der embryonale Stammzelle (ES-Zelle). Aufgrund der niedrigen Frequenz der Rekombination ($1:10^6$ bis 10^7) werden die homolog rekombinierten ES-Zellen gezielt durch die Verwendung von eingebrachten Resistenzgenen und der entsprechenden Selektion angereichert. Die *in vitro* veränderten ES-Zellen werden nach der Kontrolle auf eine korrekte homologe Rekombination in Blastozysten injiziert und diese anschließend in scheinsschwangere Mäuse implantiert. Bei Erfolg gebären die Tiere sogenannte Chimären, welche für die Erzeugung heterozygoter transgener Tiere eingesetzt werden können (Nagy et al., 2003).

Um die Funktion des veränderten Gens gezielt in verschiedenen Zelltypen oder Geweben zu untersuchen, wird das Cre-loxP- oder Flp-frt-System benutzt, wodurch das Gen induzierbar ausgeschaltet wird (Kühn et al., 1997; Lewandoski et al., 2001).

1.5.2 Das Cre-loxP- und Flp-frt-System

Cre ist eine Rekombinase aus dem Bakteriophagen P1 und besitzt eine molekulare Masse von 38 kDa (Sternberg et al., 1986). Flp ist ebenfalls eine Rekombinase mit einer vergleichbaren molekularen Masse, sie stammt allerdings aus der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* (Buchholz et al., 1991). Beide Enzyme bestehen aus zwei Untereinheiten (Dimere) und brauchen keine Kofaktoren, um ihre Funktion auszuführen (Lewandoski et al., 2001).

Die Erkennungssequenzen für beide Proteine bestehen aus zwei 34 bp langen Abschnitten, wobei jeder aus zwei 13 bp langen invertierten Sequenzwiederholungen, die ein 8 bp lange Kernsequenz umschließen, besteht. Die Sequenzwiederholungen bestimmen die Orientierung (siehe Abb. 1.11A). Das entsprechende Zielgen wird von den loxP- („locus of X-crossing over P1“) bzw. den frt- Stellen („flp-recombinase recombination target“) flankiert. Es kommt nur bei einer gleichen Orientierung der Erkennungssequenzen zu einer Deletion der markierten Sequenz durch die Cre- bzw. Flp-Rekombinase (siehe Abb. 1.11B). Eine gegenläufige Orientierung der Erkennungssequenzen führt durch die Rekombination zu einer Inversion der flankierten DNS-Sequenz (Nagy et al., 2000; Tronche et al., 2002).

1.5.3 Verwendung von eGFP als Reportergen

Um *in vivo* zu untersuchen, ob die Ausschaltung des Zielgens durch die Expression des gewünschten veränderten Proteins oder durch KO des Zielgens stattfand, kann das eGFP („enhanced green fluorescent protein“) aus der Qualle *Aequoria victoria* als Reportergen verwendet werden (Chalfie et al., 1994). Das eGFP wird durch Licht mit der Wellenlänge von

488 nm (blauer Bereich) angeregt und emittiert darauf Licht mit einer Wellenlänge von 509 nm (grüner Bereich). In der vorliegenden Arbeit wurde eGFP nicht für die Herstellung eines Fusionsproteins verwendet, sondern es soll zusätzlich zum veränderten Cx43D378stop-Protein exprimiert werden. Aus diesem Grund wurde zwischen dem *Gja1*D378stop- und dem eGFP-Gen eine IRES („Interne Ribosomen Eintrittsstelle“) einkloniert. So entsteht bei der Transkription eine bizistronische mRNS und die Proteine Cx43D378stop bzw. eGFP werden exprimiert.

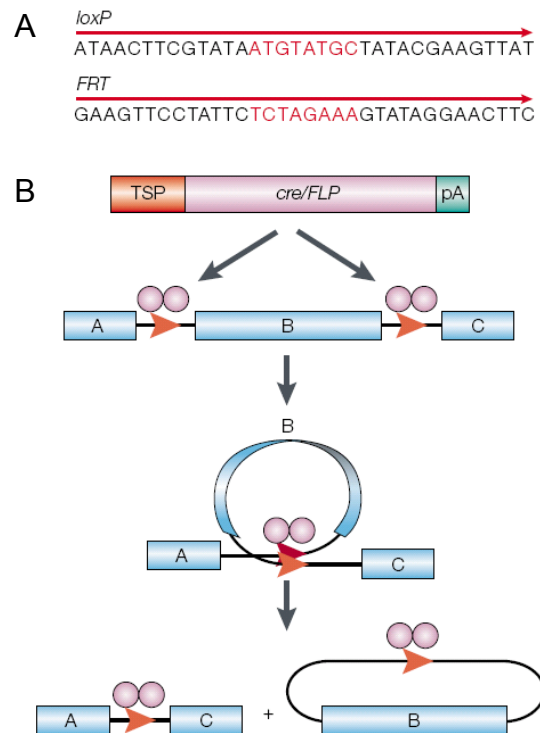


Abb. 1.11: Schematische Darstellung des Cre-loxP- und FLP-FRT-Systems. (A) Die 34 bp langen loxP- und FRT-Stellen bestehen aus zwei 13 bp langen invertierten Wiederholungen und einer 8 bp langen Kernsequenz (rot), welche die Orientierung bestimmt. (B) Die Cre- und FLP-Dimere binden an die Erkennungsstellen und vermitteln das Ausschneiden der Zielsequenz, wenn beide Erkennungssequenzen die gleiche Orientierung aufweisen (Lewandoski et al., 2001).

1.5.4 Verwendung einer Internen Ribosomen Eintrittsstelle

Eine Interne ribosomale Eintrittsstelle (IRES) dient der Initialisierung der Translation von mRNS, ohne dass diese eine 5'-Kappenstruktur aufweist. Sie ist hauptsächlich in viraler RNS zu finden (Wimmer et al., 1993). In der Länge ist eine IRES-Sequenz variabel und befindet sich immer im 5'-Nichtkodierungsbereich, wobei komplizierte Sekundärstrukturen ausgebildet werden können. In der IRES-Sequenz binden eukaryontische Initiationsfaktoren, welche die Translation starten, wobei die Sekundärstrukturen die Bindung der Ribosomen unterstützen.

Die IRES kann eine Translation in Phasen des Zellzykluses initiieren, in denen im Normalfall die Proteinbiosynthese herunterreguliert ist (Sachs et al., 1997).

1.6 Ziel der Arbeit

In der carboxyterminalen Domäne des Connexin43 liegen viele bekannte Phosphorylierungsstellen und Interaktionsdomänen. Diese regulieren in unterschiedlichem Maße die Cx43 haltigen Gap Junction-Kanäle, indem sie direkt oder indirekt Einfluss auf die Lokalisation, die Halbwertszeit oder den Öffnungszustand nehmen.

In der vorliegenden Arbeit stand die Interaktion zwischen Cx43 und dem Zonula Occludens Protein-1 im Blickpunkt. Ziel war es, eine transgene Mauslinie zu erzeugen, in der die Interaktionsdomäne des Cx43 mit dem Zonula Occludens-Protein-1 im Cx43-Protein ablatiert wurde. Um das Zusammenspiel von ZO-1 und Cx43 im Organismus vertiefend zu erforschen, wurden in dieser Arbeit die letzten fünf Aminosäurereste der carboxyterminalen Domäne des Cx43 ablatiert. Durch die zusätzliche Verwendung des eGFP als Reportergen war es möglich Zellen und Gewebe auf die Expression von Cx43D378stop und eGFP unter dem Mikroskop zu untersuchen.

Das Zusammenspiel von ZO-1 und Cx43 wurde insbesondere für das Herz vielfach untersucht und beschrieben. ZO-1 scheint dabei eine wichtige Rolle bei der Regulation der Menge von Cx43 in der Membran zu übernehmen. So kontrolliert das ZO-1-Protein, wie viel Cx43 an die äußere Peripherie von Gap Junction-Plaques gelangt. Daneben ist eine erhöhte Interaktion bei Ischämie im Herzen und somit bei der Endozytose und dem Abbau von Cx43 zu beobachten. In daran anschließenden Untersuchungen sollte durch die Verpaarung mit α MHC-Cre-Mäusen diese verkürzte Isoform anstatt des endogenen Cx43 spezifisch in Kardiomyozyten exprimiert werden. Zum Vergleich wurde die Cx43K258stop-Maus, in der die letzten 125 Aminosäurereste des Cx43 ablatiert wurden, herangezogen. Dies hatte den Verlust der ZO-1-Interaktionsdomäne sowie mehrerer anderer Phosphorylierungsstellen und Interaktionsdomänen zur Folge. Um Genaueres über die Funktion von Interaktionen und deren Einfluss auf den starken Phänotyp zu erfahren, bedarf es der spezifischen Ausschaltung der einzelnen Interaktionen.

Aus diesem Grund sollten mehrere Cx43-Ablationsmutanten erzeugt und im HeLa-Zellsystem genauer untersucht werden. Dazu gehörte die Ablation der Tubulinbindedomäne, um die Rolle von Tubulin beim Transport von Cx43 zur Membran zu untersuchen. Weiterhin wurde die CIP85-Interaktionsdomäne und deren Einfluss auf den lysosomalen Abbau und die Halbwertszeit analysiert. Zusätzlich sollte die Interaktion zwischen Cx43 und ZO-1 in HeLa-Zellen untersucht werden.

2 Material

Die aufgeführten Chemikalien werden in Analysequalität von den Firmen Gibco, Merck, Riedel-de-Haën, Sigma, Invitrogen, Difco, ICN Biomedicals, Renner, Roth und Serva bezogen. Enzyme und Nukleotide sind Produkte der Firmen New England BioLabs, Promega, Amersham Biosciences, MWG-Biotech und Roche. Nitrozellulosemembranen und Radiochemikalien werden bei Amersham Biosciences erworben.

2.1 Stammlösungen, Puffer und Medien

Bis auf die vermerkten Ausnahmen werden alle verwendeten Puffer, Lösungen und Medien in sterilem A. bidest angesetzt und bei RT aufbewahrt. Die jeweiligen pH-Werte werden mit 10 M NaOH oder HCl konz. eingestellt.

2.1.1 Allgemeine Lösungen

PBS⁻ (pH 7,2)	133 mM NaCl 2,7 mM KCl 8,1 mM Na ₂ HPO ₄ 1,4 mM KH ₂ PO ₄ für die Kultur von HeLa-Zellen 20 min autoklavieren
TBS (pH 7,5)	10 mM Tris 50 mM NaCl
Tris-HCl (pH 7,4)	1 M Tris zu ca. $\frac{3}{4}$ in 1 M HCl ansetzen und mit H ₂ O auffüllen

2.1.2 Lösungen für Arbeiten mit Nukleinsäuren

RNase 2000	100 mg RNase A 1 ml RNase T (1 x 10 ⁵ U) 49 ml RNase-Puffer 15 min kochen, langsam abkühlen lassen und in 2 ml Aliquots Lagerung bei -20°C
Proteinase K	Proteinase K 20 mg pro 1 ml H ₂ O Lagerung bei -20°C
dNTP-Mix (40 mM)	dATP, dCTP, dGTP, dTTP je 10 mM 0,6 Vol. TE-Puffer (pH 8,0) Lagerung bei -20°C
Alkalilösung 1	50 mM D(+)-Glukose 25 mM Tris 10 mM EDTA kurz vor Gebrauch wird 1 µl/ml RNase 2000 zugegeben
Alkalilösung 2	0,2 M NaOH 1 % SDS-Lösung (20 %)
Alkalilösung 3	3 M Kaliumacetat 5 M Essigsäure

ES-Lysispuffer	50 mM NaCl 20 mM Tris 100 mM EDTA 0,5 % SDS-Lösung (20 %) 2 mM CaCl ₂ ad 100 ml pH 8,0, sterilfiltrieren, kurz vor Gebrauch 50 µl Proteinase K-Lösung und 100 µl RNase 2000
Natriumacetat (pH 4,8)	3 M Natriumacetat 1 h autoklavieren
TE-Puffer (pH 8,0)	10 mM Tris-HCl (pH 8,0) 1 mM EDTA 20 min autoklavieren
TBE-Puffer (10 x)	1 M Tris 0,83 M Borsäure 10 mM EDTA
DNS-Ladepuffer (6 x)	0,25 % (v/v) Bromphenolblau 0,25 % (v/v) Xylencyanol 30 % (v/v) Glyzerol
Depurinierungslösung	0,25 M Salzsäure
Denaturierungslösung	1,5 M NaCl 0,5 M NaOH
20 x SSC (pH 7,0)	3 M NaCl 0,3 M Na ₃ Citrat 5,5 H ₂ O
Sephadex G50	30 g Sephadex G50 300 ml TE-Puffer ü.N. bei RT quellen lassen, überschüssigen TE-Puffer durch frischen ersetzen und 1 h autoklavieren
MOPS (10 x)	200 mM Morpholinopropansulfonsäure 50 mM Natriumacetat 10 mM EDTA 1 h autoklavieren, lichtgeschützt lagern
RNS-Ladepuffer	1 mM EDTA 0,4 % (v/v) Bromphenolblau 0,4 % (v/v) Xylencyanol 50 % Glyzerol

2.1.3 Medien und Lösungen für die Bakterienkultur

Alle Medien und Lösungen werden, sofern nicht anders vermerkt, im Autoklaven 20 min bei 120°C sterilisiert. Nach dem Abkühlen auf ca. 50°C erfolgt der Zusatz fehlender, hitzelabiler Komponenten, wie z.B. Antibiotika. Diese werden zuvor sterilfiltriert (Rotrandfilter; Schleicher & Schüll, 0,2 µm). Sterile Einwegartikel wie Pipetten und Plastikschaalen werden von den Firmen Falcon und Sarstedt bezogen.

Ampizillin-Stammlösung (pH 7,4) (100 mg/ml)	0,5 g Ampizillin in 5 ml A. bidest lösen, sterilfiltrieren und aliquotieren. Lagerung bei -20°C. Endkonzentration im Medium: 100 µg/ml
LB-Medium (pH 7,4)	10 g Bacto-Trypton 5 g Hefeextrakt 10 g NaCl ad 1 l
LB-Agarplatten (pH 7,4)	LB-Medium wird 1,8 % (w/v) Agar zugegeben. Die Lösung wird, ggf. nach Zugabe eines Antibiotikums warm (~ 50°C) in 10 cm Petrischalen gegossen

LB-Agarplatten (pH 7,4) mit X-Gal/IPTG	LB-Medium wird 1,8 % (w/v) Agar zugegeben, die Lösung wird, ggf. nach Zugabe eines Antibiotikums warm (~ 50°C) in 10 cm Petrischalen gegossen 20 mg/ml X-Gal und 0,5 M IPTG
---	---

2.1.4 Herstellung transformationskompetenter Bakterien

TFB I (pH 5,8)	30 mM KAc 50 mM MnCl ₂ 100 mM RbCl ₂ 10 mM CaCl ₂ 15 % (v/v) Glyzerol sterilfiltrieren
TFB II (pH 7,0)	10 mM NaMOPS (Natrium-Morpholinopropansulfonsäure) 75 mM CaCl ₂ 10 mM RbCl ₂ 15 % (v/v) Glyzerol sterilfiltrieren
YT⁺⁺-Medium (pH 7,5)	8 g Bacto-Trypton 5 g Hefeextrakt 5 g NaCl ad 1 l nach Autoklavieren und Abkühlen erfolgt die Zugabe von: 20 ml MgSO ₄ (1 M, autoklaviert) 10 ml KCl (1 M, autoklaviert)
SOB-Medium	2 % (w/v) Bacto-Trypton 0,5 % (w/v) Hefeextrakt 10 mM NaCl 2,5 mM KCl ad 1 l mit A. bidest und nach dem Autoklavieren Zugabe von 1 mM MgCl ₂
DnD	1,53g DiThiothreitol 9 ml DMSO 10 mM Kaliumacetat (pH 7,5)

2.1.5 Lösungen für die Proteinanalytik

Ammoniumpersulfat (APS) (10 %)	0,1 g APS in 1 ml deionisiertem Wasser
Blockierungslösung (Immunfluoreszenz)	5 % (w/v) BSA 5 % (w/v) NGS 0,1 % (v/v) Triton-X100 in PBS ⁻ ansetzen.
Blockierungslösung (Western Blot)	5 % (w/v) Magermilchpulver in Waschblotpuffer ansetzen. wahlweise mit 10 % Roti-Block, bei Verwendung des Cx43-NT1 Antikörpers 1 % (w/v) Magermilchpulver in PBS ⁻ ansetzen
Complete[™]-Stammlösung (Gemisch aus Proteasen- Hemmern, 25 x)	1 Tablette Complete [™] (Roche, Mannheim) in 2 ml A. bidest lösen, Lagerung bei -20°C
Coomassie Brilliant Blue[™]- Färbelösung	0,25 % Coomassie R250 10 % Essigsäure 50 % Methanol durch Faltenfilter filtrieren, lichtgeschützt bei RT lagern

Coomassie-Entfärber-Lösung	10 % Essigsäure 30 % Methanol
Elektrophorese-Puffer (10 x)	0,25 M Tris 1,92 M Glyzin 1 % (w/v) SDS
Hoechst 33258-Lösung	0,1 % (w/v) Hoechst 33258 in PBS ⁻ bei Gebrauch 1:1000 in PBS ⁻ verdünnen
Ponceau-Färbelösung	0,2 % (w/v) Ponceau S 1 % (v/v) Essigsäure lichtgeschützt bei RT lagern
Immunoblot-Transferpuffer (pH 8,1-8,3)	20 mM Tris 150 mM Glyzin 20 % Methanol
Semidryblot-Transferpuffer	48 mM Tris Base 39 mM Glyzin 20 % Methanol 0,375% SDS
Phosphatpuffer (pH 7,2)	10 mM Na ₂ HPO ₄ (pH 9,16) 10 mM NaH ₂ PO ₄ (pH 4,7)
Protein-Sammelgelpuffer (Lösung D, pH 6,8)	0,5 M Tris 0,4 % (w/v) SDS
Protein-Trenngelpuffer (Lösung B, pH 8,8)	1,5 M Tris 0,4 % (w/v) SDS
SDS-Probenpuffer („Laemmli-Puffer“)	62,5 mM Tris 3% (w/v) SDS 10 % (v/v) Glyzerol 5 % (v/v) β-Mercaptoethanol 0,01 % (v/v) Bromphenolblau
Waschblotpuffer (pH 6,3)	8 M Harnstoff 100 mM NaH ₂ PO ₄ 10 mM Tris
Sepharose-ProteinA-Gel	150 mg ProteinA Sepharose Cl-4B (Amersham) ad 500 µl TBS-Puffer, 2 h bei 4°C quellen lassen, nach Zentrifugation (5 min, 4.000 Upm, 4°C) Überstand abnehmen und im gleichen Volumen TBS-Puffer überschichten, Lagerung bei 4°C
RIPA-Puffer (pH 7,2)	10 mM Phosphatpuffer (Na ₂ HPO ₄ : NaH ₂ PO ₄ = 3:1) 0,1 % SDS 40 mM Natriumfluorid 2 mM EDTA 1 % Triton X-100 pH-Wert einstellen, ad 100 ml, 1 h autoklavieren 0,1 % Deoxycholat frisch dazugeben
RIPA-Waschpuffer	10 mM Phosphatpuffer (Na ₂ HPO ₄ : NaH ₂ PO ₄ = 3:1) 1 M NaCl 40 mM Natriumfluorid 10 mM EDTA 0,2 % Triton X-100 ad 500 ml, mit NaOH auf pH 7, 1 h autoklavieren

Lysispuffer für KoIP	1 % Triton X-100 0,5 % NP-40 50 mM NaCl 1 mM EGTA 30 mM Natriumpyrophosphat 1 mM Na_3VO_4 50 mM NaF 1 mM PMSF 2 x Complete 20 mM HEPES sterilfiltrieren
Waschpuffer für KoIP	1 mM Na_3VO_4 50 mM NaF 1 mM PMSF 2x Complete 20 mM HEPES sterilfiltrieren
Propidiumiodid-Lösung	10 mg/ml Propidiumiodid in PBS^-

2.1.6 Lösungen für den Nachweis der LacZ-Expression in Gehirnschnitten

LacZ-Basislösung (pH 7,4)	100 mM Natriumphosphat-Puffer (NaH_2PO_4 / Na_2HPO_4) 1,25 mM MgCl_2 2 mM EGTA
LacZ-Fixierungslösung	PBS^- 0,2 % Glutaraldehyd, frisch angesetzt
LacZ-Waschlösung	LacZ-Basislösung 0,01 % Deoxycholat 0,2 % Nonidet P40
X-Gal Stammlösung	2 % X-Gal in N,N'-Dimethylformamid lichtgeschützte Lagerung bei -20°C
LacZ-Substratlösung	LacZ-Waschlösung 5 mM $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ 5 mM $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ 0,08 % X-Gal

2.1.7 Medien und Lösungen für die Kultur von HeLa-Zellen

Wie alle Medien und Lösungen werden auch die Medien und Lösungen für die Zellkultur mit A. bidest angesetzt und durch Autoklavieren sterilisiert oder sterilfiltriert. Auch kommerzielle Medien und Lösungen werden so behandelt, sofern nicht bereits durch den Hersteller geschehen. Medien werden bei 4°C aufbewahrt und vor Gebrauch 15 min in einem 37°C warmen Wasserbad erwärmt. Sterile Einwegartikel wie Pipetten und Plastikschaalen kommen von den Firmen Falcon und Sarstedt.

D 10-Medium	DMEM inkl. 10% (v/v) fötalem Kälberserum (56°C , 30 min hitzeinaktiviert) 5 ml Penizillin/Streptomycin-Stammlösung
D 10-Zeozin-Medium	D 10-Medium 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Zeozin

D 10–Puromyzin-Medium	D 10-Medium 0,5 µg/ml Puromyzin
D 10–Blastizidin-Medium	D 10-Medium 3 µg/ml Blastizidin
Opti-MEM® I	Medium mit reduziertem Serumanteil
Zeozin-Stammlösung	100 mg/ml Lagerung bei –20°C
Puromyzin-Stammlösung	0,5 mg/ml Lagerung bei –20°C
Blastizidin-Stammlösung	1,5 mg/ml Lagerung bei –20°C
Penizillin/Streptomyzin-Stammlösung (pH 8,2) (100 x)	0,6% (w/v) Penizillin G 1% (w/v) Streptomyzinsulfat in Puck'scher Saline ansetzen, Lagerung bei –20°C
Puck'sche Saline	137 mM NaCl 5,4 mM KCl 5,5 mM D(+)-Glukose 4,5 mM NaHCO ₃ Lagerung bei –20°C
Trypsin (pH 7,5)	0,04 % Trypsin 0,5 mM EDTA ad 50 ml mit Puck'scher Saline sterilfiltrieren Lagerung bei –20° C oder angebrochen bei 4°C

2.1.8 Medien und Lösungen für die Kultur embryonaler Stammzellen

Bei allen Lösungen und Medien wird auf höchste Sterilität geachtet. Um eine Kontamination mit Endotoxin zu vermeiden, wird zur Herstellung der Lösungen ausschließlich endotoxin-getestetes Zellkulturwasser verwendet. Alle Lösungen und Medien werden in steriler Umgebung angesetzt bzw. anschließend autoklaviert und vor dem Gebrauch auf Raumtemperatur gebracht.

ES-WT-Medium	500 ml Glasgow-MEM 28 ml ES-Zellkultur-FCS 28 ml ES-Zellkultur-NCS 5,4 ml Natriumpyruvat, 100 mM 5,4 ml Pen-Strep, 100 x 5,4 ml Glutamin, 200 mM 5,4 ml nicht essentielle Aminosäuren, 100 x 550 µl LIF 550 µl β-Mercaptoethanol-Stammlösung Lagerung bei 4°C (ca. 4 Wochen haltbar)
ES-Selektionsmedium	550 ml ES-WT-Medium 4 ml G418-Stammlösung (350 µg/ml)
ES-Einfriermedium	17,5 ml ES-WT-Medium 2,5 ml ES-Zellkultur-FCS 5 ml DMSO (Dimethylsulfoxid) Aliquots bei –20°C ca. 1 Jahr haltbar
β-Mercaptoethanol-Stammlösung	0,7 % 2-Mercaptoethanol ad 42,6 ml mit Zellkultur-Wasser sterilfiltrieren, Aliquots à 1,2 ml, Lagerung bei –20°C ca. 1 Jahr haltbar.

1% Gelatine-Stammlösung	5 g Gelatine ad 500 ml Zellkultur-Wasser, 1h autoklavieren, Lösung mischen und nochmals 1h autoklavieren. die Stammlösung wird zur Herstellung der 0,1 % igen Arbeitslösung verwendet
ES-EDTA-Lösung (pH 7-8)	5 mM EDTA ad 500 ml ES-PBS ⁻ 1 h autoklavieren
KCl-Lösung (isotonisch)	0,56 g KCl, ad 100 ml Zellkultur-Wasser
ES-Trypsin	400 ml ES-PBS ⁻ 1 mM ES-EDTA-Lösung 1 % Chicken Serum 0,025 % Trypsin Aliquots à 50 ml, Lagerung bei -20°C
HBS-Puffer	100 ml ES-PBS ⁻ 20 mM HEPES 2,5 M Glukose Aliquots à 10 ml, Lagerung bei -20°C
G418-Stammlösung	50 mg/ml aktives G418 Sulfat 100 mM PIPES Aliquots à 10 ml, Lagerung bei -20°C

2.1.9 Lösungen für die Mikroinjektion und Nachweisverfahren

Neurobiotin-Lösung	6 % (w/v) Neurobiotin 0,4 % Rhodamin-3-Isothiocyanat Dextran 0,1 M Tris
Lucifer-Yellow-Lösung	4 % (w/v) Lucifer Yellow sterilfiltrieren und bei 4°C lichtgeschützt lagern
KCl-Stammlösung	1 M KCl in A. bidest
LiCl-Stammlösung	1 M LiCl in A. bidest
Glutaraldehyd-Lösung	1% Glutaraldehyd in PBS ⁻ frisch ansetzen
Triton X-100-Lösung	2 % Triton X-100 in PBS ⁻
Meerettich-PO-Lösung	0,1 % Meerettich Peroxidase Avidin D in PBS ⁻
Diaminobenzidin-Lösung	0,06 % Diaminobenzidin in TBS, sterilfiltrieren, Lagerung bei -20°C
DAB-Färbelösung	0,01 % H ₂ O ₂ in Diaminobenzidin-Lösung, frisch ansetzen

2.1.10 Anästhetikum

Xylazin-Ketamin	4,25 ml isotonische NaCl-Lösung 0,5 ml Rompun, 2% 0,25 ml Ketavet , 100 mg/ml zum Narkotisieren 100 µl/g Körpergewicht
------------------------	---

2.1.11 Kommerzielle Lösungen

Alle aufgeführten Lösungen wurden von den entsprechenden Firmen bezogen, die Artikelnummer befindet sich in Klammern. Die Lösungen sind alphabetisch geordnet.

Acrylamid-Stammlösung Rotiphorese Gel 30	(Roth, Art.Nr. 3029.1)
Bicinchoninic Acid	(Sigma, Art.Nr. B9643)
Chloroform	(Merck, Art.Nr. 1.02445)
Permaflour Mounting Medium	(Immunotech, Art.Nr. PN IM0752)
Dimethylsulfoxid (DMSO)	(Merck, Art.Nr. 1.02950)
ES-FCS	(Sigma Art. Nr. F2442)
ES-NCS	(Sigma Art. Nr. N-4637)
ES-PBS ⁻ (Dulbecco's Phosphate buffered saline)	(Sigma, Art.Nr. D8537)
Eisessig	(Merck, Art.Nr. 1.00063)
Ethanol	(Serva, Art.Nr. 11093)
Ethidiumbromid, 1 %	(Merck, Art.Nr. 1.11608)
FCS	(Biochrom AG Art. Nr. S0115)
Formaldehyd, 37%	(Merck, Art.Nr. 1.04003)
Giemsa Färbelösung	(Sigma, Art.Nr. GS-500)
Isopropanol	(Merck, Art.Nr. 1.09634)
Methanol	(Riedel-de-Haën, Art.Nr. 32213)
Mineral Oil als PCR-Öl	(Sigma, Art.Nr. M-5904)
QuickHyb	(Stratagene, Art.Nr. 201220)
Roti-Block (10 x)	(Roth, Art.Nr. A151.1)
Roti-Histofix 4% (pH 7)	(Roth, Art.Nr. A087.3)
Roti-Phenol/Chloroform	(Roth, Art.Nr. A156.2)
SDS-Stammlösung 10%	(Merck, Art.Nr. 1.06022.0100)
TEMED	(Sigma, Art.Nr. T-9281)
Triton X-100	(Serva, Art.Nr. 37240)
TRIzol	(Gibco BRL, Art.Nr. 15596-018)

2.2 Kommerzielle Reagenzienansätze (Kits)

Name des Reagenzienansatzes	Hersteller
Amplify	Amersham
ECL + Plus	Pierce
EndoFree Plasmid Maxi Kit	Qiagen Art.Nr. 12362
Go Taq [®] Flexi DNA Polymerase	Promega Art. Nr. M8305
Jetstar 2.0 Plasmid MIDI Kit	Genomed Art.Nr. 210050
Lipofectamine [™] 2000	Invitrogen Art. Nr. 11668019
Multiprime-DNA labelling system	Amersham Art.Nr. RPN 1601Z
Perfectprep Gel Cleanup Kit	Eppendorf Art.Nr. 0032007.759
QIAquick Gel Extraction Kit	Qiagen Art.Nr. 28706
Ready Mix Taq [™] PCR Reaction Mix	Sigma Art. Nr. P4600
Restore Western [™] Blot Stripping Buffer	Pierce Art. Nr. 21059
Super Signal [®] West Femto Maximum Sensitivity Substrate	Pierce Art. Nr. 34095
Super Signal [®] West Pico Chemiluminescence Substrate	Pierce Art. Nr. 34080

Tabelle 2.1: Auflistung der in der Arbeit verwendeten Reagenzienansätze.

2.3 Antikörper

2.3.1 Primärantikörper

Antigen	Antikörpertyp	Herkunft des Antikörpers	Verdünnung	Referenz
Cx30	polyklonal	Kaninchen	1:250 (IB)	Zymed
Cx43	polyklonal	Kaninchen	1:1.500 (IB) 1:1.000 (IF)	C. Schlieker, 2000
Cx43 L2	polyklonal	Kaninchen	1:250 (IB) 1:500 (IF)	Yeager et al. 1992
Cx43	monoklonal	Maus	1 :1.000 (IF)	Zymed
Cx43 NT1	monoklonal	Maus	1:250 (IB)	FHCRC
ZO-1	polyklonal	Kaninchen	1:1.000 (IB) 1:500 (IF)	Zymed
tubulin	monoklonal	Maus	1 :20.000	Chemicon

Tabelle 2.2: Auflistung der in der Arbeit verwendeten primären Antikörper.
(IB) = Verdünnung im Immunoblot; (IF) = Verdünnung bei Immunfluoreszenzen

2.3.2 Sekundärantikörper

	Antigen	Herkunft des Antikörpers	Verdünnung	Referenz
Alexa 488	Kaninchen	Ziege	1:1.000 (IF)	MoBiTec
Alexa 594	Kaninchen	Ziege	1:1.000 (IF)	MoBiTec
Alexa 594	Maus	Ziege	1:1.000 (IF)	MoBiTec
Cy2	Kaninchen	Ziege	1:700 (IF)	Dianova
Cy3	Kaninchen	Ziege	1:700 (IF)	Dianova
Peroxidase	Kaninchen	Ziege	1:10.000 (IB)	Dianova
Peroxidase	Maus	Ziege	1:10.000 (IB)	Dianova

Tabelle 2.3: Auflistung der in der Arbeit verwendeten sekundären Antikörper.
(IB) = Verdünnung im Immunoblot; (IF) = Verdünnung bei Immunfluoreszenzen

2.4 Nukleinsäuren

2.4.1 Oligonukleotide als Startermoleküle für die Polymerase-Kettenreaktion

Alle verwendeten Oligonukleotide wurden bei der Firma MWG-Biotech zur Herstellung in Auftrag gegeben. Sie wurden lyophilisiert geliefert und zur Herstellung einer Konzentration von 100 pmol/μl in dem vom Hersteller jeweils empfohlenen Volumen TE-Puffer gelöst.

Name	Länge	Basensequenz (5'→3'); Bindungsstelle; Referenz	PCR
Cx30 wt-5	24-mer	GGT ACC TTC TAC TAA TTA GCT TGG 5'UTR von Cx30, Gegensinnrichtung (Teubner et al., 2003)	Cx30 KO
Cx30 wt-3	24-mer	AGG TGG TAC CCA TTG TAG AGG AAG kodierender Bereich von Cx30, Sinnrichtung (Teubner et al., 2003)	Cx30 KO

Cx30 LacZ-3	24-mer	AGC GAG TAA CAA CCC GTC GGA TTC Kodierender Bereich von LacZ, Gegensinn-richtung (Teubner et al., 2003)	Cx30 KO
43del forw	22-mer	GGC ATA CAG ACC CTT GGA CTC C 3'-Ende des Cx43 Introns, Sinnrichtung (Theis et al., 2001)	43Flneu
UMPR	22-mer	TCA CCC CAA GCT GAC TCA ACC G 5'-Bereich der Cx43 kodierenden Region; Gegensinnrichtung (Theis et al., 2001)	43 Flneu
GFAP LZ1	20-mer	ACT CCT TCA TAA AGC CCT CG Promotorbereich des humanen GFAP, Sinnrichtung (Zhou et al., 2001)	GFAPcre
Cre LZ4	20-mer	ATC ACT CGT TGC ATC GAC CG Kodierende Region der Cre-Rekombinase, Gegensinnrichtung (Zhou et al., 2001)	GFAPcre
IntCre_rev	24-mer	TCC ATG AGT GAA CGA ACC TGG TCG kodierende Region der Cre-Rekombinase, Gegensinnrichtung (Lallemand et al., 1998)	Pgkcre
up-pgk 1	24-mer	GCT GTT CTC CTC TTC CTC ATC TCC im Promotor der Phosphoglycerin Kinase, Sinnrichtung (Lallemand et al., 1998)	pgkcre
USP_Flp	26-mer	TAA GGT CCT GGT TCG TCA GTT TGT GG kodierende Region der FLP-Rekombinase, Sinnrichtung (Rodriguez et al., 2000)	Flp
DSP_Flp	26-mer	GTG ATA TTA TCC CAT TCC ATG CGG GG kodierende Region der FLP-Rekombinase, Gegensinnrichtung (Rodriguez et al., 2000)	Flp
Cx43delICT- HO3	24-mer	CAA AAC ACC CCC CAA GGA ACC TAG 3'-Bereich des UTR von Cx43, Sinnrichtung (Maas et al., 2004)	K258stop
RO-delICT	24-mer	GCA TCC TCT TCA AGT CTG TCT TCG Kodierende Region von Cx43, Gegensinn (Maas et al., 2004)	K258stop
Cx43_3'HR	26-mer	CAC TTG ATA GTC CAC TCT AAG CAA CC 3' außerhalb der Homologie-Region von mCx43, Sinnrichtung (Dobrowolski, 2004)	ES 3'HR
eGFP_rev	26-mer	CAT GGA CGA GCT GTA CAA GTA AAG CG 3' Bereich der eGFP kodierenden Region, Gegensinnrichtung (Dobrowolski, 2004)	ES 3'HR
Cx43/31for	28-mer	GCA CTT GGT AGG TAG AGC CTG TCA GGT C 5' außerhalb der kodierende Region von Cx43 vor loxP, Sinnrichtung (Dobrowolski, 2004)	ES loxP
Cx43/31rev	27-mer	CTC CAC GGG TCT GTA CCC ACT GAC CTC 5' außerhalb der kodierende Region von Cx43 nach loxP, Gegensinnrichtung (Dobrowolski, 2004)	ES loxP
EcoRI mCx43 _vorHincII	29-mer	CGG AAT TCA TCT TCG GCA AGT TGG GCT CG ; kodierende Region von Cx43, Sinnrichtung	43mut
Cx43_3'UTR _EcoRI	24-mer	GTG TGA ATT CGA TTC AAA TCT GTG 3'UTR von Cx43, Gegensinnrichtung	43mut

Cx43delCT_5AS_rev	40-mer	GAT GTT CAA GCC TGT CTT AAG GCC GAG GTC TGC TGC TGG C, Ende der kodierenden Region von Cx43 mit eingefügter Punktmutation und Deletion von 15 Basen, Gegensinnrichtung	43mut
Cx43delCT_5AS_for	29-mer	CCT TAA GAC AGG CTT GAA CAT CAA GCT GC, Ende der kodierenden Region von Cx43 mit eingefügter Punktmutation und Deletion von 15 Basen, Sinnrichtung	43mut
Cx43deltub rev	40-mer	GGT GGC GTG GTA AGG ATC GCT GAA GAA GAC ATA GAA GAG C, kodierende Region von Cx43-Deletion von 30 Basen, Gegensinnrichtung	43mut
Cx43deltub for	25-mer	CTT CAG CGA TCC TTA CCA CGC CAC C kodierende Region von Cx43-Deletion von 30 Basen, Sinnrichtung	43mut
Cx43delCIP8 5_rev	30-mer	GCT TGT ACC CAG GAG GAG ACA TGG CCG TTG, kodierende Region von Cx43 mit Deletion von 12 Basen, Gegensinnrichtung	43mut
Cx43delCT_5AS_for	29-mer	CGG CCA TGT CTC CTC CTG GGT ACA AGC kodierende Region von Cx43 mit Deletion von 12 Basen, Sinnrichtung	43mut

Tabelle 2.4: Übersicht über die in der Arbeit verwendeten Oligonukleotidstartermoleküle (MWG-Biotech). Die Angabe der Orientierung bezieht sich auf die jeweilige kodierende Region.

2.4.2 Klonierungsvektoren

Die hier aufgeführten Vektoren sind so genannte Ausgangsplasmide, die bei der Klonierung der HeLa-Vektoren und des KI-Mausvektors verwendet wurden.

Name	Eigenschaften	Referenz
pBlueskript II SK(+/-)	Blau-Weiss-Selektion, Ampizillinresistenzgen, T7/T3 Promotoren, MCS	Stratagene
pGem-T easy	Blau-Weiß Selektion, Ampizillinresistenzgen, SV40 Promotor	Promega
pcDNA 3.1zeo(+)	Eukaryotischer Expressionsvektor, Ampizillin- und Zeozinresistenzgen, MCS, CMV Promotor	Invitrogen
pBlastcmv	Eukaryotischer Expressionsvektor, Ampizillin- und Blastizidinresistenzgen, SV40 Promotor	M. Weigel

Tabelle 2.5: Übersicht über die in der Arbeit benutzten Plasmide zur Herstellung der HeLa-Vektoren und des KI-Mausvektors.

2.4.3 Rekombinante Plasmide

Name	Vektor	Passagier-DNS	Referenz
IRES-eGFP-Zeo	pBSK	IRES eGFP	R. Dobrowolski
pBSKdC/a:mCx43WT	pBSK	mCx43WT	G. Schwarz
pBSK_fuer_zw.loxP	pBSK	frt-PGK-Neo-frt	J. Degen
5'HR_in_pHWlox	pBSK	5'HR von mCx43	G. Schwarz
Cx43-XbaI-10kb	pBSK	mCx43 kod. Region	G. Schwarz

Tabelle 2.6: Übersicht über die in der Arbeit verwendeten Ausgangsplasmide zur Herstellung der HeLa-Vektoren und des KI-Mausvektors.

2.4.4 Plasmide zur Herstellung von Southernblot-Sonden

Die aufgeführten Plasmide wurden zur Herstellung der Sonden bei Southernblot-Analysen benutzt.

Name	Vektor	Passagier-DNS	Sondengröße	Referenz
Cx43-XbaI-10kb	pBSK	mCx43 kod. Region	550 bp (<i>Hind</i> II)	G. Schwarz
G141	pBSK	550 bp <i>Ava</i> I Fragment aus Cx43 <i>Sac</i> II <i>Hind</i> III (G140)	550 bp (<i>Ava</i> I)	G. Schwarz

Tabelle 2.7: Übersicht über die Vektoren, die zur Gewinnung der in der Southernblot-Analyse der homologen Rekombination des mCx43D378stop-Vektors benutzten Sonden verwendet wurden.

2.5 Bakterienstämme

<i>E. Coli</i> -Stamm	Genotyp	Verwendung/ Eigenschaft	Referenz
XL1-blue	recA1, endA1, gyrA96, thi-1, Δ(mcr) A183, Δ(mcrCB-hsdSMR-mrr)173, supE44, relA1, lac[F'proAB lacIqZ Δ M15, Tn10 (Tetr 12,5 µg/ml)].	Herstellung und Vermehrung rekombinanter Plasmide	Bullock et al., 1987
DH5α	F- Φ80dLacZΔM15Δ (LacZYAargFI U129 deoR recA1endA1 hsdR17(rk-mk+) phA supE44λ- thi-1 gyrA96 relA1	Herstellung und Vermehrung rekombinanter Plasmide	RZPD
MM294-Cre (Cre- <i>E. coli</i>)	Genotyp: F-, l-, supE44, endA1, thi-1, hsdR17, LacZ:cl857-Cre, Cre-Rekombinase exprimierende <i>E. coli</i> Bakterien	Herstellung und Vermehrung rekombinanter Plasmide	Buchholz et al., 1998
MM294-Flp (Flp- <i>E. coli</i>)	Flp-Rekombinase exprimierende <i>E. coli</i> Bakterien	Herstellung und Vermehrung rekombinanter Plasmide	Buchholz et al., 1998

Tabelle 2.8: Übersicht über die in der Arbeit verwendeten Bakterienstämme.

2.6 Zell-Linien

Name	Eigenschaften	Referenz
HeLa-Wildtyp	etablierte Zell-Linie aus humanen Zervix-karzinom; aneuploid, kopplungsdefizient	Jones et al., 1971
HeLa-mCx43	transfizierte Zell-Linie; überexprimiert Cx43	Diplomarbeit Welcker, 2004
HeLa-mCx43 K258stop	Transfizierte Zell-Linie; exprimiert Cx43 ohne die letzten 125 AS	diese Arbeit
HeLa-mCx43 delZO-1	Transfizierte Zell-Linie; exprimiert Cx43 ohne die ZO-1-Proteinbindedomäne	diese Arbeit
HeLa-mCx43 deltubulin	Transfizierte Zell-Linie; exprimiert Cx43 ohne die Tubulin-Proteinbindedomäne	diese Arbeit
HeLa-mCx43 delCIP85	Transfizierte Zell-Linie; exprimiert Cx43 ohne die CIP85-Proteinbindedomäne	diese Arbeit

HM1	embryonale Stammzellen der Maus, aus agouti gefärbten Männchen. Stamm: Sv129P2/OlaHsd	Magin et al., 1992
HM1 mCx43-D378stop (Klon 200)	embryonale Stammzellen der Maus, aus agouti gefärbten Männchen. Stamm: Sv129P2/OlaHsd mit homolog rekombiniertem mCx43-D378stop Gen	diese Arbeit

Tabelle 2.9: Übersicht über die in dieser Arbeit verwendeten Zell-Linien.

2.7 Maus-Linien

Bezeichnung	Kurzbeschreibung	Bezugsquelle/Referenz
NMRI	Auszuchtstamm, albino	Charles River, Sulzfeld Lynch, 1937; eigene Zucht
C57BL/6	Inzuchtstamm, schwarz	Charles River, Sulzfeld; eigene Zucht
Cx43 ^{flox/flox}	Mauslinie mit von 3 loxP-Stellen flankierter Cx43 kodierender Region und aktivierbarem LacZ-Reporter gen	Theis et al., 2001
Cx43K258stop	Mauslinie, in der der Cx43 C-Terminus ab Aminosäure K258 deletiert wurde	Maas et al., 2004
Cx43D378stop	Mauslinie, in der die ZO-1-Bindedomäne des Cx43 am Ende des C-Terminus ab Aminosäure D378 deletiert wurde	diese Arbeit
Cx43del	Mauslinie, in der der kodierende Bereich von Cx43 durch das LacZ-Gen unter Kontrolle des Cx43 Promotors ausgetauscht wurde	Theis et al., 2001
deleter flp	Mauslinie mit flp-Rekombinase Expression	Rodriguez et al., 2000
pgk-Cre	Mauslinie mit pgk-spezifischer Cre Expression	Lallemand et al., 1998
αMHC-Cre	Mauslinie mit αMHC- spezifischer Cre Expression	Agah et al., 1997
Cx30KO; Cx43 ^{flox/flox} , hGFAP-Cre	Mauslinie mit einem LacZ-Reporter gen anstelle des Cx30 Gens; siehe Cx43 ^{flox/flox} , spezifischer hGFAP Cre Expression	Wallraff et al., 2006

Tabelle 2.10: Übersicht der in dieser Arbeit verwendeten Mausstämme

2.8 Allgemeine Labormaterialien

Pipettenspitzen und Reagenzgefäße stammen von der Firma Sarstedt. Agarose (Gibco BRL, Art.Nr. 15510-027), Faltenfilter (Schleicher & Schuell), Glaswolle (Roth, Art.Nr. 6287.1), Hybond-ECL Nitrozellulose Membran (Amersham, Art.Nr. RPN2020D), Hybond-N sowie Hybond-N+-Membran (Amersham, Art.Nr. RPN203N), Objektträger, SuperFrost Plus Objektträger (Menzel-Gläser, Art.Nr. 041300), Röntgenfilme X-OMAT AR (Sigma, Art.Nr. Z35,849-


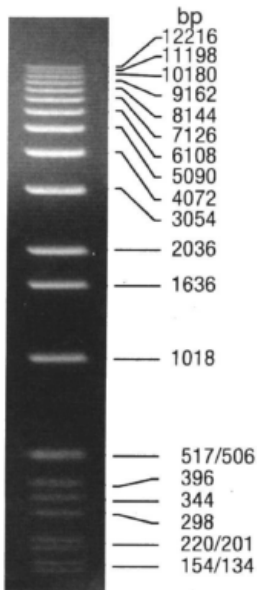
5), BIOMAX AR und BIOMAX MR (Kodak), Sterilfilter 0,4 µm und 0,2 µm (Schleicher & Schuell), Whatman 3 & 5 MM-Papier GB 002/005 (Schleicher & Schuell, Art.Nr. 426693), 1,5 ml Einfrierampullen (Nunc)

2.9 Geräte

Accu-jet Pipettierhilfe	Brand
Agarose-Elektrophoresekammern	Amersham
Axiophotmikroskop mit Epifluoreszenz	Zeiss
Axiovert 25	Zeiss
Binokular MS5	Leica
Diavert Phaco	Leica
Electrophoresis Power Supply EPS-301/EPS-601	Amersham
Entwicklermaschine Curix 60	Agfa
Gelgießvorrichtung Mighty Small™ SE245	Hoefer
Geltrockner M583	Bio-Rad
Gene Pulser™	Bio-Rad
Hera Freeze	Heraeus
Inkubatoren mit CO ₂ Regelung	Heraeus
Incubator shaker innova 4300	New Brunswick Scientific
Kapillarenzieher P-97	Sutter Instruments
Kolbenhubpipette (Pipetteman: 20, 200, 1000, 5000 µl)	Gilson
Kryostat HM 500 OM	Microm
Kühlfuge Biofuge fresco	Heraeus
Kühlfuge Multifuge 3L-R	Heraeus
LSM 510 Meta	Zeiss
Magnetrührer MR 3000	Heidolph
Mikromanipulator	Eppendorf
Mikroskop IM-35	Zeiss
Mikrowelle MW800	Continent
Mini Trans-Blot® Cell	Bio-Rad
Polytron-Homogenisator	Kinematica
Power Pac HC™	Bio-Rad
Primus 96 plus Thermocycler MWG	Biotech AG
PTC 100 Programmable Thermal Controller	Biozym
PTC 200 Programmable Thermal Controller	Biozym
Rotator SB3	Stuart
SDS-Laufkammer Might Small II SE250/SE260	Hoefer

See-saw rocker SSL4	Stuart
Spectrophotometer DU® 640	Beckman
Szintillationszähler LS 1801	Beckman
Thermoblock HB-130	Unitek
Thermomixer comfort	Eppendorf
Trans-Blot® SD	Bio-Rad
Transilluminator	TP-1
Ultraschallbad Transonic	Branson
Ultraschallspitze & ELMA Sonifer B-12	Branson
UV-Stratalinker 2400	Stratagene
Vortex Genie 2	Scientific Industries
Waage BL 1500S	Sartorius
Wasserbad E100	Lauda
Wasserbad Thermoshake	GFL

2.10 Größenstandards

100 bp DNS Leiter (Gibco BRL 15628-019)	1 kb DNS Leiter (Gibco BRL 15615-024)
 <p>bp</p> <p>- 2072</p> <p>- 1500</p> <p>- 600</p> <p>- 100</p>	 <p>bp</p> <p>12216</p> <p>11198</p> <p>10180</p> <p>9162</p> <p>8144</p> <p>7126</p> <p>6108</p> <p>5090</p> <p>4072</p> <p>3054</p> <p>2036</p> <p>1636</p> <p>1018</p> <p>517/506</p> <p>396</p> <p>344</p> <p>298</p> <p>220/201</p> <p>154/134</p>

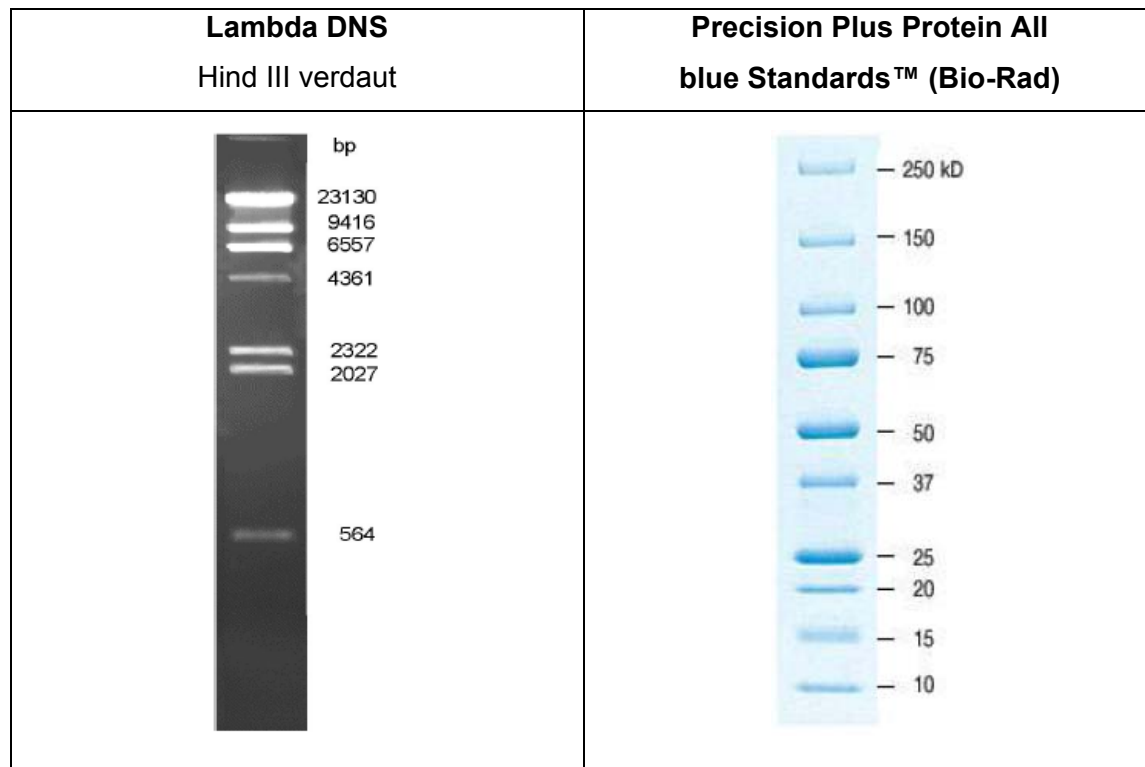


Abb. 2.1: Übersicht der verwendeten Größenstandards für die DNS- und Proteinanalytik

3 Methoden

3.1 Methoden der Analyse von Nukleinsäuren

3.1.1 Isolierung von Plasmid-DNS aus Bakterien

3.1.1.1 Analytische Plasmid-Isolierung aus Bakterien (Minipräparation)

Zur Identifizierung rekombinanter Klone durch Spaltung mit Restriktionsendonukleasen eignet sich die schnelle Isolierung von Plasmid-DNS aus Bakterien (Wilmrig, 1985). Dazu werden die aus einer Einzelkolonie hergestellten Flüssigkulturen ü.N. in einem Schüttelinkubator bei 225 Upm in 2 ml antibiotikumhaltigen LB-Medium inkubiert. In ein Eppendorfgefäß werden 1,5 ml dieser Suspension überführt und bei 10.000 Upm 1 min lang zentrifugiert. Dadurch werden die in der Flüssigkultur enthaltenen Bakterien sedimentiert. Nach dem Entfernen des Überstandes werden 100 µl der Lösung I hinzugegeben und bei RT 2 min inkubiert. Dabei werden die Bakterienzellwände zerstört und die RNS wird enzymatisch abgebaut. Nach Zugabe von 200 µl der Lösung II, einer Vermischung durch Invertion und einer darauf folgenden Inkubation von 2 min wird die chromosomale DNS gemeinsam mit den Proteinen denaturiert. Anschließend werden 150 µl der Lösung III hinzugegeben, was eine Senkung des pH Wertes zur Folge hat und so zur Renaturierung der DNS führt. Der Ansatz wird mehrmals invertiert und 6 min bei 10.000 Upm zentrifugiert. Die denaturierte und an den Zellmembranen haftende genomische DNS sowie die bakteriellen Proteine befinden sich im Pellet am Boden des Reaktionsgefäßes. Der Überstand wird weiter verwendet und in ein neues Eppendorfgefäß überführt. Es werden 500 µl Ethanol abs. zum Überstand gegeben und 10 min bei 10.000 Upm zentrifugiert. Durch die Zugabe von Ethanol wird das Löslichkeitsprodukt der DNS herabgesetzt, wodurch diese in Gegenwart von Na⁺-Ionen präzipitiert. Der Überstand wird verworfen und die DNS mit 70% Ethanol gewaschen. Darauf folgt eine 5 min-Zentrifugation bei 10.000 Upm. Der Überstand wird entfernt, das Pellet luftgetrocknet und in 100 µl TE-Puffer gelöst. Eine Inkubation von 5 min bei 65°C im Wasserbad fördert ein vollständiges Lösen der Plasmid-DNS und inaktiviert evtl. noch vorhandene DNasen. Durch diese Aufreinigungsmethode werden pro 1,5 ml Bakterienkultur ca. 2 – 5 µg DNS gewonnen.

3.1.1.2 Analytische Plasmid-Isolierung aus Bakterien (Midipräparation)

Größere Mengen Plasmid-DNS mit hohem Reinheitsgrad werden durch Ionen-Austausch-Chromatographie gewonnen. Hierfür wird der Reagenziensatz Jetstar 2.0 Plasmid MIDI Kit verwendet. Die Präparation erfolgt nach den Angaben des Herstellers. Je nach Ausbeute (100 – 200 µg bei „high copy-Plasmiden“ und einem Kulturvolumen von 50 ml) und in

Abhängigkeit von ihrer weiteren Verwendung wird die Plasmid-DNS in 100 – 200 µl A. bidest oder TE-Puffer aufgenommen und ist bei 4°C bzw. -20°C lagerbar.

3.1.1.3 Endotoxinfreie Plasmid-Isolierung aus Bakterien (Maxipräparation)

Zur Präparation großer Mengen an Plasmid-DNS (bis zu 500 mg) mit höchstem Reinheitsgrad ohne Verunreinigungen durch bakterielle Proteine wird das EndoFree Plasmid Maxi Kit der Firma Qiagen verwendet. Die Isolierung für die stabile Transfektion embryonaler Stammzellen benötigten Plasmide erfolgt nach Herstellerangaben unter Verwendung von Einmal-Plastikpipetten. Die isolierte und sedimentierte Plasmid-DNS wird unter sterilen Bedingungen in endotoxinfreiem TE-Puffer aufgenommen und weiterverwendet.

3.1.2 Isolierung genomischer DNS

3.1.2.1 DNS-Gewinnung für PCR-Tests aus HeLa-Zellen

Zur DNS Gewinnung aus HeLa-Zellen werden die Zellen zweimal mit PBS⁻ bei RT und einmal mit PBS⁻ (4°C) auf Eis gewaschen. Anschließend werden 500 µl Laird Puffer hinzupipettiert und die Zellen mit einem Gummischaber vom Schalenboden gelöst, in ein Reaktionsgefäß überführt und bei 55°C ü.N. im Schüttelbad unter Zugabe von 5 µl ProteinaseK inkubiert. Der Ansatz wird für 10 min bei 13.000 Upm und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wird vorsichtig abgenommen und durch Zugabe von 500 µl Isopropanol und mehrmaliges Invertieren wird die DNS gefällt. Es folgt eine Zentrifugation für 10 min bei 13.000 Upm und 4°C. Anschließend wird der Überstand abgenommen und das DNS-Pellet mit 70% Ethanol für 5 min bei 13.000 Upm und 4°C gewaschen. Erneut wird der Überstand abgenommen und das Pellet für 10 min bei RT getrocknet und anschließend in 200 µl TE-Puffer mindestens 1 h im 55°C Wasserbad gelöst. Die Lagerung der DNS erfolgt bei 4°C.

3.1.2.2 DNS-Gewinnung für PCR-Tests aus embryonalen Stammzellen

Zur DNS-Gewinnung aus HM1-Zellen für einen PCR-Test auf homologe Rekombination wird die Hälfte der trypsinierten Zellen aus einer 48-Lochschale in ein PCR-Reaktionsgefäß überführt, 5 min bei 13.000 Upm zentrifugiert und in 40 µl 1 x PCR-Puffer mit 1 µl Proteinase K aufgenommen. Es folgt eine Inkubation ü.N. bei 55°C. Die Lagerung der DNS erfolgt bei 4°C.

3.1.2.3 DNS-Gewinnung aus Mausschwanzspitzen für die Genotypisierung

Zur Genotypisierung von Mäusen wird eine 0,5 cm lange Schwanzspitzenbiopsie in 0,5 ml Laird-Lysispuffer inklusive 5 µl Proteinase K (20 mg/ml) über Nacht bei 55°C lysiert. Durch

Zentrifugation bei 13.000 Upm für 10 min bei 4°C werden Zellrückstände und Haare vom Lysat getrennt. Der Überstand wird vorsichtig abgenommen und durch Zugabe von 500 µl Isopropanol und mehrmaliges Invertieren wird die DNS gefällt. Es folgt eine Zentrifugation für 10 min bei 13.000 Upm und 4°C. Anschließend wird der Überstand abgenommen und das DNS-Pellet mit 70% Ethanol für 5 min bei 13.000 Upm und 4°C gewaschen. Erneut wird der Überstand abgenommen und das Pellet für 10 min bei RT getrocknet und anschließend in 100 µl TE-Puffer mindestens 1 h im 55°C Wasserbad gelöst. Die Lagerung der DNS erfolgt bei 4°C.

3.1.2.4 DNS-Gewinnung für die Southernblot-Analyse aus embryonalen Stammzellen

Zur DNS-Gewinnung aus HM1-Zellen für eine Southernblot-Analyse wird ein konfluent bewachsener T25-Kolben nach zweimaligem Waschen mit ES-PBS⁻ mit 1,5 ml des ES-Lysispuffer 1 h auf dem Schüttler inkubiert. Die zähflüssige Suspension wird in ein 2 ml Schraubdeckelreaktionsgefäß überführt und für mindestens 2 Tage bei 55°C im Wasserbad inkubiert. Anschließend wird der gesamte Ansatz in ein phenolresistentes Schraubdeckelreaktionsgefäß überführt. Dazu kommen 2 ml Roti-Phenol/Chloroform und nach kurzem Mischen wird 15 min bei 6.000 Upm zentrifugiert. Es bilden sich 3 Phasen, die obere wird vorsichtig in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Durch die Zugabe von 1 ml Isopropanol und anschließendem Schütteln wird die DNS gefällt. Die DNS-Flocke wird mit autoklavierten Pipettenspitzen vorsichtig in ein neues Gefäß überführt und mit 5 ml 70% Ethanol 15 min gewaschen. Durch Zentrifugation bei 6.000 Upm für 5 min wird die DNS sedimentiert, für 15 min bei RT getrocknet und in 100 µl TE-Puffer gelöst. Es werden 10 µl der gewonnenen DNS zur Restriktionsspaltung für die Southernblot-Analyse eingesetzt. Die Lagerung erfolgt bei 4°C.

3.1.2.5 DNS-Gewinnung für die Southernblot-Analyse aus der Leber von Mäusen

Nach der Tötung der Mäuse des gewünschten Genotyps durch zervikale Dislokation wird die Leber zur DNS-Gewinnung entnommen, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und gegebenenfalls bei -70°C gelagert. Die gefrorenen Leberproben werden mit Hilfe von in flüssigem Stickstoff vorgekühlten Schraubzylindern und Metallstäben mit einem Hammer zu Pulver zermörsert, das in phenolresistenten 50 ml-Röhrchen gesammelt wird, in denen 10 ml-Lysis-Puffer vorgelegt sind. Nach der Lysis bei 55°C ü.N. im Wasserbad werden 10 µg/ml RNase 2000 zugegeben und die Ansätze bei 250 Upm und 37°C ü.N. inkubiert bis keine Gewebeklumpen mehr sichtbar sind. Zur Abtrennung der DNS-haltigen Lösung erfolgt die Zugabe von 10 ml Roti-Phenol/Chloroform. Der Ansatz wird für 30 min bei 6.000 Upm zentrifugiert, anschließend wird die obere Phase vorsichtig abgenommen und in ein neues 50 ml-Gefäß überführt. Durch Mischen des Ansatzes nach Zugabe von zwei Volumen Ethanol abs. und

1/50 Volumen 3 M NaCl-Lösung wird eine DNS-Flocke sichtbar, die mit einem sterilen Zahnstocher aus der Lösung entnommen werden kann. Die DNS wird 2 h bei RT in 70 % Ethanol unter Schütteln gewaschen und anschließend 30 min luftgetrocknet. Durch Zugabe von 1 ml TE-Puffer und 50 µl RNase 2000 wird die DNS bei 55°C ü.N. im Wasserbad gelöst. Es werden 10 µl der gewonnenen DNS zur Restriktionsspaltung für die Southernblot-Analyse eingesetzt. Die Lagerung erfolgt bei 4°C.

3.1.3 Agarose-Gelelektrophorese

3.1.3.1 Größenfraktionierung nativer DNS

Nukleinsäuren sind im gelösten Zustand bei neutralem pH-Wert aufgrund ihrer sauren Phosphatgruppen negativ geladen und wandern zur Anode. Dabei wirkt die Gelmatrix, die die Nukleinsäuren durchwandern müssen, als molekulares Sieb, in dem größere Nukleinsäuremoleküle stärker zurückgehalten werden als kleinere. Die Wanderungsgeschwindigkeit der DNS im elektrischen Feld ist direkt proportional zum dekadischen Logarithmus ihres Molekulargewichts, welches von der Anzahl der Basenpaare bestimmt wird. Um DNS-Fragmente von 100 bp bis 20 kb nach ihrer Größe aufzutrennen, wird diese Proportionalität der DNS-Fragmentgröße zur Wanderungsgeschwindigkeit bei der nativen Agarose-Gelelektrophorese ausgenutzt.

Es werden Gele in Agarose-Konzentrationen von 0,7 bis 2,0 % mit 0,7 x TBE-Puffer durch Aufkochen hergestellt und nach dem Abkühlen mit 0,6 µg/ml Ethidiumbromid versetzt, einem mit UV-Licht anregbarem Farbstoff. Zur DNS wird 6 x Ladepuffer hinzugegeben und anschließend auf das Agarosegel aufgetragen. Durch die Interkalation des Ethidiumbromids in die DNS können die aufgetrennten Fragmente mit Hilfe eines UV-Transilluminators sichtbar gemacht werden (ImageMaster, Pharmacia).

Fragmentgröße	0,05 – 0.6 kb	0,15 – 2 kb	0,3 – 10 kb	0,5 – 20 kb
Agarosekonzentration (w/v):	2,0 %	1,5 %	0,7%	0,5 %

Tabelle 3.1: Verwendete Agarosekonzentrationen zur Auftrennung bestimmter Fragmentgrößen.

3.1.4 DNS-Transfer (Southernblot)

Der durchgeführte Southernblot (Southern 1975) beruht auf dem Prinzip des Kapillarblots. Die vollständig gespaltene DNS wird über Agarosegelelektrophorese aufgetrennt und anschließend mit einem fluoreszierenden Lineal unter dem UV-Transilluminator dokumentiert. Während einer 15minütigen Inkubation in Depurinisierungslösung bei RT wird das Gel depuriniert und anschließend für 30 min bei RT denaturiert (Denaturierungslösung). Das Gel wird kurz in A. bidest gewaschen und dann für 20 min bei RT neutralisiert (Neutralisierungslösung).

lösung). Für den Aufbau des Kapilarblots wird in eine Melaminschale 20 x SSC als Transferpuffer gefüllt und darüber eine Glasscheibe gelegt, auf die folgender Aufbau gesetzt wird: eine mit 20 x SSC getränkte Brücke aus Whatmanpapier, das Gel mit den Taschen nach unten, eine positiv geladene Hybond N Nylonmembran wird luftblasenfrei aufgelegt, 2 weitere Whatmanpapierlagen, sowie ein Paket Papiertücher (Tork). Das Ganze wird mit einer Glasplatte und einem Gewicht von 1 kg beschwert. Um eine Wanderung des Transferpuffers direkt in die Papiertücher zu vermeiden, werden die Kontaktstellen mit Parafilm oder Haushaltsfolie abgedeckt. So wird sichergestellt, dass der Transferpuffer erst durch das DNS-haltige Gel, die Membran und schließlich in die Papiertücher wandert. Der Transfer findet über mindestens 24 h statt. Nach Beendigung des DNS-Transfers wird die Position der Geldaschen auf der Membran vermerkt, die DNS auf der Membran UV-vernetzt und die Membran anschließend bei RT getrocknet.

3.1.4.1 Herstellung radioaktiver Sonden mit dem Multiprime-Reagenziensatz

Die Herstellung radioaktiver Sonden zum Nachweis genomischer DNS wird mit dem Multiprime-Reagenziensatz (Amersham) durchgeführt. 50 ng des DNS-Fragments, welches aus einem Agarosegel eluiert wurde und als Sonde eingesetzt werden soll, werden mit 5 µl Primer-Hexamer-Lösung und entsprechender Menge Wasser auf ein Endvolumen von 36 µl gebracht. Nach der 5minütigen Denaturierung in kochendem Wasser und sofortiger Abkühlung auf Eis wird dem Ansatz 10 µl Labellingpuffer zugegeben und für 5 min bei RT inkubiert. Im Isotopenlabor werden 2 µl Klenow-Enzym und 2 µl des radioaktiven 32-α-dCTP beigefügt. Die enzymatische Reaktion wird bei 37°C für 45 min durchgeführt. Währenddessen wird eine Sephadex-Säule hergestellt. Dazu wird etwas silikonisierte Glaswolle in eine 1 ml-Spritze gepresst und anschließend mit Sephadex G50 aufgefüllt. Die Spritze wird 5 min bei 1.000 Upm in einem 15 ml Reaktionsgefäß zentrifugiert, so dass eine Säule mit einem Endvolumen von ungefähr 800 µl entsteht. Der Sonde werden 150 µl TE-Puffer beigefügt und auf die Säule aufgetragen. Bei der anschließenden Zentrifugation (1000 UPM, 5 min) wird die Sonde aufgefangen, die zum Sondaufbau nicht verwendeten Nukleotide verbleiben im Säulenmaterial. In der folgenden Szintillationsmessung wird die Radioaktivität der Sonde gemessen. Dazu wird 1 µl der Sonde samt der Pipettenspitze in eine Plastikflasche überführt und in das USER5-Rack (Beckman) des Szintillationsgerätes eingelegt. Eine Lagerung der Sonde bei ausreichender Strahlung ist im Bleigefäß ü.N. möglich.

3.1.4.2 Hybridisierung und Nachweis der radioaktiven DNS-Sonde

Um eine unspezifische Bindung der Sonde an die Membran zu vermeiden, wird diese mit 18 ml einer vorgewärmten QuickHyb-Lösung (Amersham) bei 68°C für 30 bis 60 min im Hybridisierungsofen vorhybridisiert. Die Sonde wird für 5 min gekocht, damit die DNS denaturiert,

und anschließend sofort in die QuickKHyb-Lösung in den Hybridisierungsröhrchen pipettiert. Die Hybridisierung erfolgt für 2 h bei 68°C im Hybridisierungsofen. Anschließend wird die nicht gebundene Sonde durch mehrere Waschschr tte entfernt. Dazu wird die Membran in eine Kunststoffschale überführt und mit Waschlösung (2 x SSC/0,1 % SDS) abgespült. Es folgen zwei Waschschr tte bei 68°C mit 2 x SSC/0,1 % SDS für je 15 min und zwei Waschschr tte bei 68°C mit 0,1 x SSC/0,1 % SDS für je 15 min. Die Abnahme der Radioaktivität auf der Membran wird nach jedem Waschschr tt mit einem Handmessgerät kontrolliert. Nach dem letzten Waschschr tt wird die Membran feucht in Frischhaltefolie eingeschweißt und in eine Autoradiographiekassette überführt, anschließend wird ein Röntgenfilm aufgelegt. Der Nachweis der Sonde erfolgt durch die Ionisierung des Röntgenfilms, welcher nach der Entwicklung an den ionisierten Stellen dunkel erscheint. Die Expositionszeiten bewegen sich im Bereich von zwei Tagen bis mehreren Wochen, solange wird die Autoradiographiekassette bei -70°C gelagert.

3.1.5 Aufreinigung von DNS aus Agarosegelen

Zur präparativen Aufreinigung von DNS-Fragmenten zwischen 200 bp und 20 kb, z.B. nach einer Spaltung durch Restriktionsendonukleasen, werden sie durch eine Agarosegelelektrophorese einer Auftrennung nach Größe unterzogen. Das gewünschte, Ethidiumbromid-gefärbte DNS-Fragment wird anschließend unter langwelligem UV-Licht (302 nm) aus dem Agarosegel ausgeschnitten, um die Gefährdung einer Schädigung der DNS zu minimieren. Die Aufreinigung des DNS-Fragments aus dem Agarosegel erfolgt mit Hilfe des Reagenzien-satzes Perfect Prep CleanUp Kit (Eppendorf) nach Herstellerangaben.

3.1.6 Natriumacetat-F llung von DNS

Weil Nukleinsäuren in Gegenwart von Natrium- bzw. Ammoniumionen und Ethanol als Kationen-DNS-Salze ausfallen, kann dies zur Umpufferung oder Konzentrierung von DNS genutzt werden. Zur gelösten DNS werden 1/10 Vol. Natriumacetat (3 M, pH 5,2) und 2,5 Vol. eiskaltes Ethanol abs. gegeben. Der Ansatz wird durch Invertieren gemischt und bei -70°C für 30 min inkubiert. Alternativ kann zur Volumenverring rung statt des Ethanols auch 0,6 - 1 Vol. Isopropanol eingesetzt werden, wobei dann eine Inkubation 30 min bei RT erfolgt. Das Präzipitat wird durch eine anschließende Zentrifugation (13.000 Upm, 4°C, 30 min) sedimentiert und nach dem Entfernen des Überstands mit 1 ml Ethanol 70% von Salzen befreit. Nach dem Trocknen des Pellets wird die DNS im gewünschten Volumen TE-Puffer oder A. bidest gelöst.

3.1.7 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

3.1.7.1 Photometrische Konzentrationsbestimmung

Konzentration und Reinheit von Nukleinsäuren können anhand der Absorption von UV-Licht bestimmt werden. Das Absorptionsmaximum der heterozyklischen Nukleotidbasen liegt bei 260 nm (A_{260}) und das aromatischer Aminosäurereste bei 280 nm (A_{280}). Die Absorption von Nukleinsäurelösungen wird bei 260 nm und 280 nm gegen TE-Puffer als Referenz gemessen (Quarzküvetten, Spektralphotometer). Eine Absorptions-Einheit entspricht bei einem Strahlengang von 1 cm Länge einer Konzentration von 50 µg/ml DNS bzw. 40 µg/ml RNS. Der Quotient A_{260}/A_{280} beschreibt den Reinheitsgrad der Lösung und sollte für Nukleinsäuren im Bereich von 1,8 bis 2,0 liegen.

3.2 Polymerase-Kettenreaktion

Die Polymerase-Kettenreaktion (engl. „Polymerase Chain Reaction“, PCR) dient der gezielten enzymatischen *in vitro*-Vervielfältigung eines bestimmten DNS-Abschnittes (Mullis und Faloona, 1987). Dabei binden zwei Oligonukleotid-Startermoleküle gegenläufig an die denaturierten komplementären DNS-Stränge, die das gewünschte Fragment flankieren. Ausgehend von den 3'-OH-Enden dieser beiden Startermoleküle synthetisiert eine hitzestabile DNS-Polymerase, standardmäßig die *Taq*-DNS-Polymerase aus dem thermophilen Bakterium *Thermus aquaticus* (Promega), nach Vorgabe der DNS-Matrizen neue komplementäre DNS-Stränge, die nach erneuter Denaturierung selbst als Matrize fungieren. Viele hintereinander ablaufende Zyklen aus Denaturierung der DNS-Doppelstränge, Anlagerung der Startermoleküle und DNS-Synthese bewirken eine exponentielle Amplifikation der gewünschten Sequenz.

3.2.1 Ableiten von PCR-Startermolekülen (Primerdesign)

Startermoleküle einer PCR bestehen meist aus 18 - 30 Basen und enthalten eine zu den Enden des zu amplifizierenden DNS-Fragmentes komplementäre Sequenz. Dabei leitet sich ein Startermolekül vom Sinnstrang („upstream primer“), das andere vom Gegensinnstrang („downstream primer“) ab. Das Verhältnis von G/C-Gehalt zu A/T-Gehalt in einem Startermolekül liegt idealerweise bei 1:1, um jedoch eine stabilere Bindung bei niedrigen Temperaturen des Moleküls an die Matrize zu ermöglichen, kann der GC-Gehalt auch höher gewählt werden. Die Schmelztemperatur eines PCR-Startermolekül-Paares, der T_m -Wert, sollte in etwa gleich sein und zwischen 55 bis 80°C liegen. Darüber hinaus sollte ein Startermolekül nicht mehr als vier gleiche Basen nacheinander enthalten, um falsche Hybridisierungen und

Leserasterverschiebungen zu vermeiden. Es ergibt sich für Startermoleküle von mehr als 14 Nukleotiden Länge folgende Gleichung:

$$T_m \text{ in } [^{\circ}\text{C}] = 69.3^{\circ}\text{C} + 0.41 \times (\text{GC-Gehalt in } \%) - 650 / \text{Startermoleküllänge}$$

Es ist darauf zu achten, dass sich am 3'-Ende eines PCR-Startermoleküls ein Nukleotid mit einer oder zwei Cytosin- oder Guaninbasen befindet, eine Anhäufung von GC-Basen am 3'-Ende kann jedoch Fehlpaarungen stabilisieren. Es sollten sich möglichst keine internen Sekundärstrukturen (Haarnadeln) ausbilden, die Startermoleküle sollten nicht miteinander hybridisieren, also an den 3'-Enden möglichst wenig Komplementarität besitzen, um sich nicht gegenseitig zu binden. Gegebenenfalls kann mit Hilfe der Startermoleküle über ihr 5'-Ende eine Restriktionsschnittstelle in das PCR-Produkt eingebracht werden, um eine gerichtete Klonierung zu ermöglichen.

3.2.2 Mutagenese-PCRs zur Amplifikation von Cx43-Deletionsmutanten

Mit Hilfe von jeweils 3 verschiedenen PCRs werden verschiedene Cx43-Deletionsmutanten erzeugt. Zuerst werden zwei PCR-Reaktionen durchgeführt, die jeweils die erwünschte Deletion am 3'- bzw. am 5'-Ende beinhalten, anschließend werden die beiden PCR-Produkte bei einer Überhangs-PCR (overlap extension PCR) zu einem langen PCR-Produkt vereinigt, das in einen Vektor inseriert werden kann (siehe Abb. 4.1).

3.2.2.1 Mutagenese-PCR zur Amplifikation der Cx43D378stop-Mutation

Reaktionsansatz PCR1:

0,3 µl	EcoRI/Cx43_vorHincII
0,3 µl	Cx43delICT_5AS_rev
0,3 µl	dNTP (10 mM each)
5 µl	5x <i>Taq</i> -Puffer
1 µl	<i>Taq</i> -Polymerase
1 µl	Plasmid Cx43- <i>Xba</i> I-10kb
<u>42,1 µl</u>	H ₂ O
50 µl	

Reaktionsansatz PCR2:

0,3 µl	Cx43delICT_5AS_for
0,3 µl	Cx43_3'UTR_ <i>Eco</i> RI
0,3 µl	dNTP (10 mM each)
5 µl	5x <i>Taq</i> -Puffer
1 µl	<i>Taq</i> -Polymerase
1 µl	Plasmid Cx43- <i>Xba</i> I-10kb
<u>42,1 µl</u>	H ₂ O
50 µl	

Reaktionsprogramm für PCR1 & 2:

95°C	5 min
94°C	30 sec
55°C	30 sec
72°C	1 min 30 sec
Goto 2 29 x	
72°C	10 min
	End

PCR1 ergibt ein Amplikon 1,4 kb, PCR2 ein Amplikon von 0,9 kb.

Reaktionsansatz PCR3:

0,3 µl	<i>EcoRI</i> mCx43_vor <i>HincII</i>
0,3 µl	Cx43_3'UTR_ <i>EcoRI</i>
1 µl	DNS-Fragmente aus Elution von PCR1
1 µl	DNS-Fragmente aus Elution von PCR2
25 µl	ReadyMix Red <i>Taq</i>
<u>22,4 µl</u> H ₂ O	
50 µl	

Reaktionsprogramm PCR3:

95°C	5 min
94°C	30 sec
50°C	30 sec
72°C	3 min
Goto 2	34 x
72°C	10 min
	End

PCR3 ergibt ein Amplikon von 2,3 kb.

3.2.2.2 Mutagenese-PCR zur Amplifikation der Cx43_(Δ234-243)-Mutation

Reaktionsansatz PCR1:

0,3 µl	<i>EcoRI</i> mCx43_vor <i>HincII</i>
0,3 µl	Cx43deltubrev
1,2 µl	dNTP (10 mM each)
5 µl	5x <i>Taq</i> -Puffer
1 µl	<i>Taq</i> -Polymerase
1 µl	Plasmid Cx43- <i>XbaI</i> -10kb
<u>41,2 µl</u> H ₂ O	
50 µl	

Reaktionsansatz PCR2:

0,3 µl	Cx43deltubfor
0,3 µl	Cx43_3'UTR_ <i>EcoRI</i>
1,2 µl	dNTP (10 mM each)
5 µl	5x <i>Taq</i> -Puffer
1 µl	<i>Taq</i> -Polymerase
1 µl	Plasmid Cx43- <i>XbaI</i> -10kb
<u>43,1 µl</u> H ₂ O	
50 µl	

Reaktionsansatz PCR3:

0,3 µl	<i>EcoRI</i> mCx43_vor <i>HincII</i>
0,3 µl	Cx43_3'UTR_ <i>EcoRI</i>
1 µl	DNS-Fragmente aus PCR1
1 µl	DNS-Fragmente aus PCR2
25 µl	ReadyMix Red <i>Taq</i>
<u>22,4 µl</u> H ₂ O	
50 µl	

PCR1 ergibt ein Amplikon von 1,35 kb, PCR2 ergibt ein Amplikon von 0,95 kb, PCR3 ergibt ein Amplikon 2,3 kb. Die Reaktionsprogramme sind die gleichen wie in Abschnitt 3.2.2.1 beschrieben.

3.2.2.3 Mutagenese-PCR zur Amplifikation der Cx43_(Δ254-257)-Mutation

Reaktionsansatz PCR1:

0,3 µl	<i>EcoRI</i> mCx43_vor <i>HincII</i>
0,3 µl	Cx43delCIP85_rev
0,3 µl	dNTP (10 mM each)
5 µl	5x <i>Taq</i> -Puffer
1 µl	<i>Taq</i> -Polymerase
1 µl	Plasmid Cx43- <i>XbaI</i> -10kb
(100ng)	
<u>42,1 µl</u> H ₂ O	
50 µl	

Reaktionsansatz PCR2:

0,3 µl	Cx43delCIP85for
0,3 µl	Cx43_3'UTR_ <i>EcoRI</i>
0,3 µl	dNTP (10 mM each)
5 µl	5x <i>Taq</i> -Puffer
1 µl	PWO-Polymerase
1 µl	Plasmid Cx43- <i>XbaI</i> -10kb
(100ng)	
<u>42,1 µl</u> H ₂ O	
50 µl	

Reaktionsansatz PCR3:

0,3 µl	<i>EcoRI</i> mCx43_vor <i>HindIII</i>
0,3 µl	Cx43_3'UTR_ <i>EcoRI</i>
1 µl	DNS-Fragmente aus PCR1
1 µl	DNS-Fragmente aus PCR2
25 µl	ReadyMix Red <i>Taq</i>
<u>22,4 µl</u>	H ₂ O
50 µl	

PCR1 ergibt ein Amplikon von 1,35 kb, PCR2 ergibt ein Amplikon von 0,95 kb, PCR3 ergibt ein Amplikon 2,3 kb. Die Reaktionsprogramme sind die gleichen wie in Abschnitt 3.2.2.1 beschrieben.

3.2.3 PCR-Analyse zum Nachweis der homologen Rekombination des Cx43D378stopKI-Vektors in ES-Zellen

Reaktionsansatz für 3'HR PCR:

2,5 µl	5x PCR Puffer
1 µl	genomische DNS
1 µl	DNS
<u>8 µl</u>	H ₂ O
12,5 µl	
0,4 µl	Cx43_3'HR
0,2 µl	eGFP_rev
0,5 µl	dNTP (10 mM each)
1,7 µl	MgCl ₂
2,5 µl	5x PCR Puffer
0,2 µl	<i>Taq</i>
<u>7 µl</u>	H ₂ O
12,5 µl	

Reaktionsprogramm:

95°C	15 min
80°C	für immer
95°C	5 min
95°C	1 min
67°C	1 min
72°C	1 min
Goto 4 35 x	
72°C	10 min
End	

Die 3'HR-PCR liefert den Nachweis der richtigen homologen Rekombination des 3'- Bereiches des mCx43D378stopKI-Austauschvektors, wodurch ein Amplikon von 1,2 kb entsteht.

Reaktionsansatz für loxP PCR:

2,5 µl	5x PCR Puffer
1 µl	genomische DNS
1 µl	DNS
<u>8 µl</u>	H ₂ O
12,5 µl	
0,2 µl	Cx43/31for
0,2 µl	Cx43/31rev
0,5 µl	dNTP (10 mM each)
1,7 µl	MgCl ₂
2,5 µl	5x PCR Puffer
0,2 µl	<i>Taq</i>
<u>7 µl</u>	H ₂ O
12,5 µl	

Reaktionsprogramm:

95°C	15 min
80°C	für immer
95°C	5 min
94°C	45 sec
60°C	45 sec
72°C	1 min
Goto 4 34 x	
72°C	10 min
End	

Die loxP-PCR liefert den Nachweis der richtigen homologen Rekombination des 5'-Bereiches des mCX43D378KI-Austauschvektors, wodurch ein 324 bp Amplikon entsteht (277 bp wenn die homologe Rekombination nicht stattgefunden hat).

3.2.4 PCR-Analyse transgener Mäuse

3.2.4.1 PCR-Nachweis des Cx43D378stop-Transgens

Reaktionsansatz:		Reaktionsprogramm:	
0,2 µl	VorLoxP	95°C	5 min
0,2 µl	In kod Reg.Cx43	95°C	1 min
0,2 µl	Vor poly A	61°C	1 min
0,5 µl	dNTP (10 mM each)	72°C	1 min
1,7 µl	MgCl ₂	GoTo2 34 x	
4 µl	5x PCR Puffer	72°C	10 min
0,1 µl	Taq		End
<u>12,1 µl</u>	H ₂ O		
19 µl			

Ein Amplikon von 350 bp weist auf den WT Locus für Cx43 hin, ein Amplikon von 400 bp auf das Vorhandensein einer loxP-Stelle in diesem Locus, ein zusätzliches Amplikon von 650 bp weist auf eine ausgeschnittene Neomycin-Kassette hin (nach Verpaarung mit deleter-FLP Mäusen).

3.2.4.2 PCR-Nachweis des deletierten Cx43-Allels

Reaktionsansatz:		Reaktionsprogramm:	
0,2 µl	43delfor	94°C	4 min
0,2 µl	43delrev	94°C	2 min
0,4 µl	dNTP (10 mM each)	65°C	1 min
4 µl	MgCl ₂	72°C	1 min 30 sec
5 µl	5x PCR Puffer	Goto 2 24 x	
0,1 µl	Taq	72°C	10 min
<u>14,1 µl</u>	H ₂ O		End
24 µl			

Ein Amplikon von 670 bp weist auf die Abwesenheit der kodierenden Region von mCX43 hin, welches durch ein LacZ-Gen ausgetauscht wurde.

3.2.4.3 PCR-Nachweis gefloxter Cx43-Allele

Reaktionsansatz:		Reaktionsprogramm:	
1 µl	43del forw	94°C	5 min
1 µl	UMPR	94°C	2 min
1,5 µl	dNTP (10 mM each)	65°C	1 min
2 µl	MgCl ₂	72°C	1 min 30 sec
5,4 µl	5x PCR Puffer	Goto 2 24 x	
0,1 µl	Taq	72°C	10 min
1 µl	DNS		End
<u>12,8 µl</u>	H ₂ O		
25 µl			

Ein Amplikon von 500 bp weist auf den Cx43 WT Lokus hin, ein Amplikon von 650 bp auf einen von loxP-Stellen eingerahmtes Cx43 Lokus.

3.2.4.4 PCR-Nachweis des Cx43K258stop Transgens

Reaktionsansatz:		Reaktionsprogramm:	
0,2 µl	Cx43delICT-HO3r	95°C	5 min
0,2 µl	RO-delICT	94°C	30 sec
0,5 µl	dNTP (10 mM each)	62°C	45 sec
2 µl	MgCl ₂	72°C	1 min
5 µl	5x PCR Puffer	Goto 2 39 x	
0,2 µl	Taq	72°C	10 min
2 µl	DNS		End
<u>14,9 µl</u>	H ₂ O		
25 µl			

Ein Amplikon von 851 bp weist auf den Cx43 WT Lokus hin, ein Amplikon von 452 bp auf ein Cx43K258stop Transgen.

3.2.4.5 PCR-Nachweis des Cx30 Knock-outs (KO's)

Reaktionsansatz:		Reaktionsprogramm:	
1 µl	Cx30 wt-5	94°C	5 min
1 µl	Cx30 wt-3	92°C	45 sec
1 µl	Cx30 LacZ-3	60°C	45 sec
1 µl	dNTP (10 mM each)	72°C	45 sec
2 µl	MgCl ₂	Goto 2 34 x	
5,8 µl	5x PCR Puffer	72°C	10 min
0,1 µl	Taq		End
1 µl	DNS		
<u>12,1 µl</u>	H ₂ O		
25 µl			

Ein Amplikon von 544 bp weist auf den Cx30 WT Lokus hin, ein Amplikon von 460 bp auf die Abwesenheit des Cx30 Gens hin, welches durch ein LacZ-Gen ausgetauscht wurde.

3.2.4.6 PCR-Nachweis des α MHC-Cre Transgens

Reaktionsansatz:		Reaktionsprogramm:	
0,8 μ l	Cre3'	94°C	5 min
0,8 μ l	MHC5'	94°C	1 min
2,5 μ l	dNTP (10 mM each)	60°C	1 min
1,5 μ l	MgCl ₂	72°C	1 min 30 sec
5 μ l	5x PCR Puffer	Goto 2 29 x	
0,1 μ l	<i>Taq</i>	72°C	10 min
1,0 μ l	DNS		End
<u>13,3 μl</u> H ₂ O			
24 μ l			

Ein Amplikon von 400 bp weist auf die Anwesenheit des α MHC-Cre Transgens hin.

3.2.4.7 PCR-Nachweis des hGFAP-Cre Transgens

Reaktionsansatz:		Reaktionsprogramm:	
1 μ l	GFAP LZ1	94°C	5 min
1 μ l	Cre LZ4	94°C	1 min
1 μ l	dNTP (10 mM each)	60°C	1 min
1 μ l	MgCl ₂	72°C	1 min
5,8 μ l	5x PCR Puffer	Goto 2 29 x	
0,1 μ l	<i>Taq</i>	72°C	10 min
1 μ l	DNS		End
<u>14,1 μl</u> H ₂ O			
25 μ l			

Ein Amplikon von 200 bp weist auf die Anwesenheit des hGFAP-Cre Transgens hin.

3.2.4.8 PCR-Nachweis des PGK-Cre Transgens

Reaktionsansatz:		Reaktionsprogramm:	
0,2 μ l	IntCre_rev	94°C	5 min
0,2 μ l	up-pgk 1	94°C	1 min
0,2 μ l	dNTP (10 mM each)	60°C	1 min
2 μ l	MgCl ₂	72°C	2 min
5 μ l	5x PCR Puffer	GoTo2 39 x	
0,1 μ l	<i>Taq</i>	72°C	10 min
<u>16,3 μl</u> H ₂ O			End
24 μ l			

Ein Amplikon von 200 bp weist auf die Anwesenheit des PGK-Cre Transgens hin.

3.2.4.9 PCR-Nachweis des deleter FLP Transgens

Reaktionsansatz:		Reaktionsprogramm:	
0,2 µl	USP_Flp	96°C	5 min
0,2 µl	DSP_Flp	95°C	30 sec
0,2 µl	dNTP (10 mM each)	68°C	50 sec
1,5 µl	MgCl ₂	72°C	1 min 30 sec
5 µl	5x PCR Puffer	GoTo2 34 x	
0,1 µl	Taq	72°C	10 min
<u>16,8 µl</u>	H ₂ O		End
24 µl			

Ein Amplikon von 1,2 kb weist auf die Anwesenheit des deleter FLP Transgens hin.

3.3 Enzymatische Modifikation und Rekombination von DNS

3.3.1 Spaltung doppelsträngiger DNS mit Restriktionsendonukleasen

Restriktionsendonukleasen vom Typ II schneiden doppelsträngige DNS an palindromischen Nukleotid-Abfolgen von 4 bis 8 bp Länge. Infolge der Restriktion entstehen entweder glatte Doppelstrangenden oder kohäsive Enden mit einem 3'- oder 5'-Überhang. Für die vollständige Spaltung von DNS werden 2 Einheiten (units) der Restriktionsendonuklease pro µg DNS in den mitgelieferten Puffersystemen bei der vom Hersteller angegebenen Temperatur eingesetzt. Die Inkubationszeit beträgt standardmäßig 1 Stunde.

3.3.2 Herstellung von glatten Doppelstrangenden (Blunten)

Die Herstellung von glatten Doppelstrangenden ist nötig, um nicht kompatible, kohäsive Enden durch diese Veränderung miteinander verknüpfbar zu machen. Die überhängenden Einzelstrangenden werden mit Hilfe des Klenow-Fragments, des großen Fragments der DNS-Polymerase I aus *E.coli*, zu glatten Enden aufgefüllt. Dabei können nur die kohäsiven Enden aufgefüllt werden, die mit dem 5'-Einzelstrang überhängen; 3'-Überhänge können durch das Fehlen des 3'-OH und der Matrize nicht verändert werden (fehlende 5'-3'-Exonukleaseaktivität). Der Restriktionsansatz wird auf Puffer H (Roche) umgepuffert und mit 1 µl Klenow-Polymerase (1U/µl) und 1 µl dNTP-Mix (jedes dNTP 2,5 mM) 30 min bei 37°C inkubiert.

3.3.3 Dephosphorylierung von Vektorenden

Weist ein linearisierter Vektor bei einer Rekombination mit Passagier-DNS komplementäre, überhängende Enden auf, muss verhindert werden, dass er vorzugsweise religiert. Anderenfalls treten bei einer Transformation hauptsächlich nicht-rekombinante Klone auf. Deshalb werden die durch die Restriktion entstandenen, freien 5'-Phosphatgruppen mit der

alkalischen Phosphatase aus Krabben (Shrimp alkaline Phosphatase, SAP) entfernt, indem der Restriktionsansatz mit 2 µl, maximal jedoch mit 1/10 des Reaktionsvolumens, SAP und 1/10 Vol. 10 x Phosphatasepuffer versetzt und für 30 min bei 37°C inkubiert wird. Da die SAP hitzelabil ist, werden anschließend weitere 1,5 µl SAP hinzugegeben und für weitere 30 min bei 37°C inkubiert. Es folgt eine Hitzeinaktivierung der SAP bei 65°C für 30 min. Damit ist eine Verknüpfung des Vektors durch die T4-Ligase nur über die phosphorylierten 5'-Enden der Passagier-DNS möglich.

3.3.4 Ligation der doppelsträngigen DNS-Fragmente

Die Ligation von DNS-Fragmenten wird mit Hilfe der T4-DNS-Ligase durchgeführt. Diese verknüpft ATP-abhängig freie 5'-Phosphatgruppen mit freien 3'-Hydroxylgruppen von DNS-Molekülen durch die Bildung von Phosphodiesterbindungen. Vektor- und Passagier-DNS werden zur Ligation in einem molaren Verhältnis von 1:3 eingesetzt. Das Reaktionsvolumen wird zwecks häufiger Interaktionsereignisse zwischen den Reaktionspartnern mit 10 bis 15 µl möglichst gering gehalten. Die DNS-Gesamtmenge sollte 100 ng nicht unterschreiten. Der Ansatz aus Vektor- und Passagier-DNS, 10 x Ligasepuffer und je nach Gesamtvolumen 1 bis 1,5 µl T4-Ligase (1 U/µl) wird ü.N. bei 16°C im Wasserbad inkubiert. Der 10 x Ligasepuffer darf nur kurz aufgetaut werden, um den Abbau des ATP zu vermeiden. Um die Ligation zu optimieren, werden am nächsten Tag noch einmal 1 µl Enzym, 1 µl 10 x Ligasepuffer und 8 µl A. bidest pro Ansatz zugegeben und 2 Stunden bei RT inkubiert. Zur Kontrolle der Ligation wird eine Reaktion mit dephosphoryliertem Vektor und H₂O anstelle von Passagier-DNS durchgeführt.

Bei Verwendung des pGem T-easy-Vektors (Promega) wurde die Transformation nach Herstellerangaben und wie unter Abschnitt 3.4.2 beschrieben durchgeführt. Nach einer Inkubation ü.N. im 37°C warmen Brutschrank auf LB Ampizillin/X-gal/IPTG-Platten wurden nur die weißen Klone gepickt, da die blauen weiterhin die β-Galactosidase umsetzen konnten und somit kein Insert aufgenommen haben.

3.4 Transformation von Bakterienzellen

Unter der Transformation von Bakterienzellen wird die Aufnahme freier Fremd-DNS zur Erlangung neuer Fähigkeiten verstanden. Experimentell wird dieser Vorgang dazu genutzt, um Plasmid-DNS in größeren Mengen zu gewinnen oder etwa Proteine in Bakterien zu exprimieren. Zur Transformation werden speziell angefertigte kompetente Zellen verwendet, die durch ihre poröse Zellwand leichter freie DNS aufnehmen können.

3.4.1 Herstellung transformationskompetenter Bakterien

Bei diesem Verfahren (Hanahan, 1983) wird die Bakterienzellwand durch Behandlung mit Schwermetallen porös gemacht. Der gewünschte Bakterienstamm wird auf einer antibiotikumhaltigen Agarplatte ü.N. bei 37°C kultiviert. 1 ml dieser Übernachtskultur wird mit YT⁺⁺-Medium 1:100 verdünnt und so lange bei 37°C geschüttelt, bis eine optische Dichte bei 600 nm zwischen 0,4 und 0,55 erreicht ist. Anschließend wird die Kultur mindestens 10 min durch Schwenken auf Eis abgekühlt und bei 6.000 Upm 10 min bei 4°C zentrifugiert. Nach vollständiger Entfernung des Kulturmediums werden die sedimentierten Bakterien im Kühl-labor (4°C) in 30 ml TFB I resuspendiert, 10 min auf Eis inkubiert und erneut sedimentiert (3.000 Upm, 4°C, 5 min). Nach Verwerfen des Überstandes wird das Bakteriensediment im Kühl-labor in 4 ml TFB II aufgenommen. 100 µl der Bakteriensuspension werden in 1,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäße aliquotiert und sofort in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Auf diese Weise sind die kompetenten Bakterien mehrere Monate bei -70°C lagerbar.

3.4.2 Transformation von *E.coli*-Bakterien

Es werden pro Transformationsansatz 100 µl kompetente Bakterien auf Eis aufgetaut und anschließend vorsichtig resuspendiert. Nach der Zugabe der Plasmid-DNS (10 bis 100 ng) und vorsichtigem Durchmischen erfolgt eine dreißigminütige Inkubation des Transformationsansatzes auf Eis. In dieser Zeit adsorbiert die DNS an die bakterielle Zellwand, der anschließende Hitzeschock der Bakterien für 90 sec bei 42°C bewirkt die Aufnahme der DNS. Die Bakterien werden sofort 2 min auf Eis abgekühlt. Um die plasmidkodierte Resistenzeigenschaft zu exprimieren zu können, werden die Bakterien in jeweils 900 µl LB-Medium ohne Antibiotikum für mindestens 30 min bei 37°C im Thermoschüttler (225 Upm) inkubiert. Anschließend erfolgen eine kurze Zentrifugation und die Entfernung des Überstandes. Die sedimentierten Bakterien werden in dem restlichen Medium resuspendiert und auf einem Selektionsnährboden mit dem entsprechenden Antibiotikum ausplattiert. Mit dem Deckel nach unten werden die angeimpften und angetrockneten Agarplatten ü.N. bei 37°C im Brutschrank inkubiert.

3.4.3 Transformation von MM294-Flp und MM294-Cre *E. coli*-Bakterien

Die Bakterienstämme MM294-Flp und MM294-Cre exprimieren die Rekombinasen Flp bzw. Cre, deren Gene stabil im Bakteriengenom integriert wurden (Buchholz et al., 1998). Eine Transformation dieser Bakterienstämme mit Plasmiden, die Erkennungsstellen der zwei Rekombinasen tragen, ermöglicht eine schnelle und zuverlässige Analyse der Funktionalität der *frt*- bzw. *loxP*-Sequenzen. Diese erfolgt durch eine Restriktionsanalyse der durch die Rekombinasen veränderten Plasmide. Die Transformation erfolgt wie in Abschnitt 3.4.2 beschrieben, die Inkubation der Kultur im Schüttelinkubator erfolgt jedoch bei 30°C anstatt

bei 37°C. Die Aufreinigung der Plasmide wird nicht wie unter Abschnitt 3.1.1.1 beschrieben durchgeführt; die Inkubationszeiten von jeweils 2 min nach Zugabe der Lösungen I bis III entfallen, um einen Abbau der Plasmid-DNS zu verhindern.

3.4.4 Identifizierung rekombinanter Klone

Nur erfolgreich transformierte Bakterien, die das Plasmid mit kodiertem Resistenzgen aufgenommen haben, sind in der Lage, in Anwesenheit eines Selektionsantibiotikums zu wachsen. Dabei können Bakterien, welche ein religiertes Vektorrückgrat ohne die gewünschte Passagier-DNS aufgenommen haben bzw. falsch inserierte Passagier-DNS beinhalten, neben korrekt rekombinanten Bakterien existieren. Der Anteil nicht-rekombinanter Klone wird mit Hilfe eines Selektionsnährbodens abgeschätzt, auf welchem mit dem Kontroll-Ligationsansatz transformierte Bakterien ausplattiert werden. Die Identifikation der Bakterienklone erfolgt durch analytische Plasmid-Präparation (wie unter Abschnitt 3.1.1.1 beschrieben), einer Restriktionsanalyse der gewonnenen DNS und der anschließenden Agarosegelelektrophorese.

3.4.5 Anlegen von Glyzerolkulturen

Glyzerolkulturen eignen sich für eine längerfristige Lagerung von Bakterien. Dazu werden 800 µl einer bakteriellen ü.N.-Kultur mit 200 µl 87 % Glyzerol versetzt, gründlich gemischt und sofort in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Bakterien bleiben so über 1-2 Jahre bei -70°C stabil. Häufiges Auftauen ist jedoch zu vermeiden. Zur Rekultivierung wird unter sterilen Bedingungen etwas gefrorenes Material von der jeweiligen Glyzerolkultur abgekratzt, zur Vereinzelung auf einem geeigneten Nährboden ausgestrichen und bei 37°C ü.N. inkubiert.

3.5 Zellkultur

3.5.1 Kultivierung von HeLa-Zellen

HeLa-Zellen stammen aus einem menschlichen Zervix-Karzinom (Jones et al. 1971) und stellen eine etablierte, adhärent wachsende Zell-Linie dar. Da die hier eingesetzten Zellen kopplungsdefizient sind (Elfgang et al. 1995), eignen sie sich nach einer Transfektion mit einem oder mehreren Connexin-Genen zur Untersuchung der Eigenschaften von Gap Junction-Kanälen. Alle Arbeiten zur Kultivierung von HeLa-Zellen werden in Sterilbänken mit Laminar-Luftstrom (BDK) nach den gängigen Methoden der Zellkultur durchgeführt. Die Inkubation der Zellen erfolgt in Brutschränken (Heraeus) mit wassergesättigter Atmosphäre bei 37° C und 10 % CO₂.

3.5.1.1 Allgemeine Kulturbedingungen

Die Zellen werden in unbeschichteten Plastikschaalen (Falcon) kultiviert. Als Kulturmedium für HeLa-Wildtyp-Zellen dient D10-Medium, während alle in dieser Arbeit hergestellten HeLa-Transfektanten mit einem Selektionsmedium kultiviert werden – dem D10-Zeocin-, D10-Puro- oder dem D10-Blasticidin-Medium. Der Wechsel der Kulturmedien erfolgt alle 2 bis 3 Tage. Ab einer Konfluenz von etwa 80 % ist ein entsprechendes Aufteilen der HeLa-Zellen erforderlich. Dazu werden die mit PBS⁻ gewaschenen Zellen durch eine fünfminütige Inkubation mit der Trypsin-Lösung bei 37°C vom Schalenboden gelöst. Klopfen gegen den Rand der Schale bewirkt eine Vereinzelung der Zellen. Nach der Inaktivierung des Trypsins durch die Zugabe von Kulturmedium (Verdünnung und Inaktivierung des Enzyms) werden die Zellen in ein 15 ml-Zentrifugationsröhrchen überführt und für 5 min bei 800 Upm und RT zentrifugiert. Der Überstand wird abgenommen und die Zellen vorsichtig mit Medium resuspendiert, anschließend werden die Zellen in der gewünschten Verdünnung ausplattiert. PBS⁻ und die Kulturmedien werden vor ihrer Verwendung auf 37°C temperiert.

3.5.1.2 Auftauen von HeLa-Zellen

Zum Auftauen von in flüssigem Stickstoff tiefgefrorenen Zellen wird die Zellsuspension in der Einfrierampulle bei 37°C im Wasserbad aufgetaut und zügig in ein 15 ml-Röhrchen überführt, in welchem 9 ml D10-Medium vorgelegt sind. Nach einem Zentrifugationsschritt (800 Upm, RT, 5 min, Beckman CPKR) werden die sedimentierten Zellen in frischem D10-Medium bzw. D10-Selektions-Medium resuspendiert und ausplattiert.

3.5.1.3 Stabile Transfektion von HeLa-Zellen durch Lipofektion

Als Transfektion wird die Einführung von Fremd-DNS in eukaryotische Zellen bezeichnet. Bei der Lipofektion mit Lipofectamine™ 2000 wird die DNS von den lipophilen Resten des Detergenz (Lipofectamine) eingeschlossen, wodurch sie in die Zellen eingebracht werden kann. Zur Transfektion werden HeLa-Zellen mit 60 % Konfluenz verwendet. Hierzu werden sie 12 h zuvor in 10 cm Kulturschaalen ausplattiert. Zur Transfektion werden 6 µg Plasmid-DNS eingesetzt, welche zuvor mit einem geeigneten Restriktionsenzym linearisiert wurde. Die DNS wird für 5 min in 750 µl Opti-MEM® inkubiert, zur selben Zeit werden auch 30 µl Lipofectamine™ 2000 in 750 µl Opti-MEM® bei RT inkubiert. Danach werden beide Ansätze zusammenpipettiert, vorsichtig gemischt und für weitere 20 min bei RT inkubiert. Anschließend wird der Ansatz vorsichtig tropfenweise auf die zu transfizierenden Zellen pipettiert. Die so behandelten Zellen werden 24 h bei 5 % CO₂ und 37°C inkubiert. Anschließend wird das Medium durch neues Kulturmedium ersetzt. Nach weiteren 48 h folgt die Selektion.

3.5.1.4 Selektion und Isolierung einzelner Klone

Nach 48 h Inkubation in D10-Medium sollten alle transfizierten Zellen das auf dem Plasmid kodierte Resistenzgen exprimieren, wodurch eine Selektion mit dem entsprechenden D10-Selektions-Medium erfolgen kann. Die Zellen werden von den 10 cm-Kulturschalen nach zweimaligem Waschen mit PBS⁻ trypsinisiert, in Verdünnungen von 1:5 bis 1:50 in entsprechendem Medium auf neue 10 cm-Kulturschalen ausplattiert und weiter kultiviert (37°C, 5 % CO₂). Bei der Selektion der Zellen mit Zeocin und Blasticidin dauert die Selektion etwa 2 Wochen, in dieser Zeit sind alle nicht transfizierten Zellen abgestorben. Nach einer weiteren Woche sind diejenigen Zellen abgestorben, die den Vektor nicht stabil in ihr Genom integriert haben. Nach etwa 3 Wochen Kultur im Selektionsmedium sind auf der Kulturschale einzelne Zellansammlungen (Klone) zu erkennen, die aus einer einzelnen Zelle stammen. Wenn eine ausreichende Größe der HeLa-Klone erreicht ist (ca. 300 Zellen), werden die Zellen eines Klons mit Hilfe einer gelben Pipettenspitze von der Kulturschale in ein einzelnes Loch einer 48-Lochschale überführt. Dabei ist eine runde Morphologie des Klons ein wichtiger Hinweis auf seine Homogenität. Es folgt eine Vermehrung der Zellmasse eines jeden Klons.

3.5.1.5 Einfrieren von HeLa-Zellen

Zum Einfrieren von HeLa-Zellen wird eine konfluent bewachsene 10 cm-Schale nach dem Trypsinieren in D10-Medium aufgenommen und zentrifugiert (800 Upm, RT, 5 min). Die sedimentierten Zellen werden in 900 µl Medium resuspendiert und mit 100 µl DMSO vermischt, welches in einer Einfrierampulle vorgelegt ist. Die Ampulle wird sofort in eine Einfrierbox gestellt, welche zuvor mit eiskaltem Isopropanol gefüllt wurde, und bei -70°C gelagert. Nach mindestens einem Tag erfolgt die Überführung der Ampulle zur Langzeitlagerung in die flüssige Phase des Stickstoffs.

3.5.2 Kultivierung von ES-Zellen

HM1-embryonale Stammzellen (ES-Zellen) wurden aus agoutifarbenen, männlichen Blastozysten des Mausstammes Sv129P2/OlaHsd isoliert (Magin et al., 1992). Sie wachsen auf gelatinisierten Kulturschalen in Gegenwart von löslichem LIF in Abwesenheit von Fibroblasten („feeder“-Zellen). Die Kultivierung embryonaler Stammzellen erfolgt in Heraeus-Inkubatoren in einer wassergesättigten Atmosphäre bei 37°C und 5% CO₂-Gehalt.

3.5.2.1 Allgemeine Kulturbedingungen

HM1-Zellen werden in ES-WT-Medium gehalten, welches täglich gewechselt wird. Das Splitten von HM1-Zellen erfolgt bei einer Konfluenz von etwa 90 bis 100 % durch Trypsinierung und anschließende Ausplattierung mit einer Verdünnung von 1:3. Bei Kulturgrößen von

48-Loch- und 24-Loch-Schalen werden die Zellen ohne eine Zentrifugation gesplittet, diese erfolgt erst ab einer Kulturgröße von einer konfluenten 6-Loch-Schale. Für eine Trypsinierung wird das alte Kulturmedium abgesaugt und die Zellen einmal mit ES-PBS⁻, einmal mit ES-Trypsin gewaschen. Anschließend wird etwa 1/10 des Kulturvolumens an ES-Trypsin zugegeben. Nach einer Inkubation von 5 min bei 37°C wird das Trypsin durch Zugabe von ES-WT-Medium inhibiert, die Zellen gründlich vereinzelt und die in Suspension befindlichen Zellen in ein 15 ml Zentrifugationsröhrchen überführt. Nach einer Zentrifugation (5 min, 800 Upm, RT) und dem Absaugen des Überstandes wird das Zellpellet in entsprechender Menge ES-WT-Medium oder ES-Selektionsmedium aufgenommen und in der Verdünnung auf gelatinisierte (durch Inkubation von 5 min mit 0,1 %-iger Gelatine-Arbeitslösung) Kulturschalen ausplattiert. Die neuen Kulturschalen werden anschließend mit frischem ES-Medium auf das entsprechende Kulturvolumen aufgefüllt. Die Passagenzahl erhöht sich pro Trypsinierung um eins, was auf den Kulturgefäßen notiert werden muss.

3.5.2.2 Auftauen von ES-Zellen

Die Prozedur des Auftauens von ES-Zellen gleicht der von HeLa-Zellen (3.5.1.2). Es wird jedoch ES-WT-Medium benutzt und auf gelatinisierten 6-Loch-Schalen ausplattiert.

3.5.2.3 Elektroporation von ES-Zellen

Die Elektroporation wird zur Transfektion von Fremd-DNS in ES-Zellen benutzt. Hierzu werden die Zellen einer hohen Spannung ausgesetzt, so dass ihre Membranen kurzfristig löchrig werden. Die DNS kann anschließend in das Innere der Zellen diffundieren. Um den ES-Zellen einen zusätzlichen Wachstumsschub zu geben, wird vormittags das Medium gewechselt und nachmittags elektroporiert. Ein konfluenter T75-Kolben wird mit 3 ml Trypsin 5 min bei 37°C inkubiert, anschließend durch Klopfen gut vereinzelt und mit 7 ml Medium 6 bis 8 Mal auf- und abpipettiert. 0,5 ml der Zellsuspension wird in 10 ml PBS⁻ verdünnt und ausgezählt. Die übrigen Zellen werden zentrifugiert (5 min, 800 Upm, RT) und auf 30 Mio. Zellen in 1 x HBS eingestellt. Die in HBS-Puffer gelösten Zellen werden mit der linearisierten DNS gründlich vermischt und in der Elektroporationsküvette elektroporiert. Eine erfolgreiche Elektroporation wird mit „time const = 0,1“ vom Gerät angezeigt. Es folgt eine Inkubation für 10 min bei RT. Die Zellen werden auf 22 vorbereitete 10 cm Schalen (gelatinisiert und mit 9 ml ES-WT-Medium aufgefüllt) verteilt. Um sicherzugehen, dass entstehende Klone gut pickbar sind, werden unterschiedliche Verdünnungen der Zellen auf den Schalen angefertigt: 4 x 0,75 Mio, 4 x 2,2 Mio, 12 x 1,5 Mio Zellen. Zur Kontrolle werden nicht elektroporierte Zellen gleichzeitig in Kultur gebracht und mit ES-Selektionsmedium gefüttert.

3.5.2.4 Selektion der ES-Zellklone

Die Selektion auf Expression des Resistenzgens Neomycin wird 24 h nach der Elektroporation durch Wechsel des ES-WT-Mediums auf ES-Selektionsmedium begonnen. Das Selektionsmedium wird alle 3 Tage gewechselt. Das Absterben der Klone erfolgt relativ schnell (nach 3 Tagen), so dass die resistenten Klone nach etwa 5 Tagen durch das Mikroskop zu erkennen sind. Die Klone erreichen allerdings erst nach etwa 10 Tagen Selektion eine Größe, welche die Isolierung der einzelnen Zellklone ermöglicht. Das Picken der Klone erfolgt ähnlich wie bei HeLa-Zellen mit einer gelben Pipettenspitze unter dem Mikroskop. Die Klone werden mit 100 µl Medium in eine gelatinisierte 48-Loch-Schale überführt. Der Zellklumpen wird durch mehrmaliges Auf- und Abpipettieren vereinzelt. Abschließend erfolgt die Zugabe von ES-WT-Medium, das alle 2-3 Tage gewechselt wird, bis der Zellklon eine ausreichende Konfluenz zum Trypsinieren besitzt. Bei dem ersten Trypsinierungsschritt von einer 48-Loch- auf eine neue 48-Loch-Schale wird die Hälfte der Zellsuspension zum schnellen PCR-Test auf homologe Rekombination (siehe 3.1.2.2) abgenommen. Die Expansion der in der PCR positiv identifizierten Klone erfolgt schrittweise über eine 24-Loch-, 12-Loch-, 6-Loch-Schale und schließlich zwei konfluente T25-Kolben. Die Zellen des einen Kolbens werden für die später gegebenenfalls zu erfolgende Blastozysten-Injektion eingefroren, die Zellen des anderen Kolbens werden erneut auf zwei T25-Kolben gesplittet. Ein Kolben wird zur genomischen DNS-Gewinnung aus embryonalen Stammzellen (siehe Abschnitt 3.1.2.2) und anschließender Southernblot-Hybridisierung eingesetzt, der andere Kolben für die Karyotypanalyse.

3.5.2.5 Einfrieren von ES-Zellen

Zum Einfrieren von Kulturzellen werden die Zellen eines konfluent bewachsenen T25 Kolbens nach dem Trypsinieren in 10 ml ES-WT-Medium aufgenommen und in 15 ml-Röhrchen überführt. Diese Suspension wird zentrifugiert (5 min, 800 Upm, RT), die sedimentierten Zellen in 1,5 ml ES-WT-Medium aufgenommen und resuspendiert. Je 500 µl dieser Suspension werden auf drei beschriftete Einfrierampullen verteilt, in denen 500 µl ES-Einfriermedium vorgelegt sind. Die Ampullen werden in eine mit kaltem Isopropanol vorbereitete Einfrierbox mindestens einen Tag bei -70°C inkubiert, bis sie anschließend in die flüssige Phase des Stickstoffs überführt werden.

3.6 Arbeiten zur Charakterisierung von HeLa-Transfektanten

3.6.1 Visueller Nachweis des grünfluoreszierenden Proteins (GFP) in lebenden HeLa-Zellen

Der visuelle Nachweis des grünfluoreszierenden Proteins (GFP) in lebenden Zellen ist relativ einfach, da weder eine Fixierung der Zellen noch eine besondere Vorbereitung nötig ist. Die Zellen werden in 3 cm-Schalen kultiviert, bis sie eine Dichte von 80 bis 90 % erreichen. Das Medium wird durch PBS⁻ ersetzt (wegen einer pH-Wert Verschiebung beginnen die Zellen nach 20 min apoptotisch zu werden). Mit Hilfe des LSM 510 Meta der Firma Zeiss erfolgt die Auswertung. Hierzu wird ein Tauchobjektiv direkt in das PBS⁻ getaucht, durch eine Anregung des GFP mit einer Wellenlänge von 470 nm wird das Protein sichtbar.

3.6.2 Indirekte Immunfluoreszenz-Analyse an HeLa-Zellen

Immunfluoreszenz-Analysen ermöglichen den Nachweis eines Proteins in fixierten Zellen mit Hilfe von Antikörpern. Darüber hinaus können Aussagen über die Lokalisation des Proteins in der Zelle gemacht werden. Bei der indirekten Immunfluoreszenz-Analyse werden zwei Antikörpertypen verwendet. Der erste Antikörper richtet sich spezifisch gegen das gesuchte Protein (primäre Antikörper) und wird vom zweiten Antikörper an seiner speziesspezifischen Fc-Domäne erkannt (sekundäre Antikörper). Diese sekundären Antikörper sind an Farbstoffmoleküle gekoppelt, welche bei Anregung mit Licht der entsprechenden Wellenlänge fluoreszieren und somit indirekt das gesuchte Protein nachweisen. HeLa-Zellen werden 2 Tage auf sterilen Deckgläschen in einer 24-Loch-Schale bis zu einer Konfluenz von 85 bis 95 % kultiviert. Nach zweimaligem Waschen mit PBS⁻ werden die Zellen entsprechend dem jeweiligen Protokoll fixiert. Unspezifische Bindungsstellen der HeLa-Zellen werden durch Inkubation in jeweils 200 µl Blockierungslösung abgesättigt (RT, 1 h, Wippe). Anschließend werden die Zellen mit 200 µl der in Blockierungslösung verdünnten primären Antikörper inkubiert (RT, 1 h, Wippe). Nach dreimaligem Waschen in PBS⁻ (RT, jeweils 5 – 10 min, Wippe) erfolgt die Inkubation mit 200 µl der in Blockierungslösung verdünnten sekundären Antikörper (RT, 1 h, Wippe). Alle weiteren Schritte werden lichtgeschützt durchgeführt, um die Farbstoffmoleküle der sekundären Antikörper nicht auszubleichen. Die Zellen werden zweimal mit PBS⁻ gewaschen (RT, jeweils 5 min, Wippe). Die Deckgläschen werden kurz in A. bidest geschwenkt, trocken getupft und mit der Kulturseite nach unten auf einem Objektträger in einem Tropfen Permaflour Mounting-Medium eingedeckelt. Die so behandelten Zellen werden lichtgeschützt bei 4°C gelagert und mit Hilfe des Laserscanmikroskops LSM 510 der Firma Zeiss ausgewertet.

3.6.2.1 Fixierungsmethoden der HeLa-Zellen

Die am häufigsten verwendete Fixierungsmethode ist die Fixierung mit Alkohol durch Wasserentzug. Hierzu werden HeLa-Zellen auf Deckgläschen in einer 24-Loch-Schale bis zu einer Dichte von 80 bis 90 % kultiviert. Nach der Entfernung des Mediums und mehrfachem Waschen mit PBS⁻ erfolgt eine Inkubation der Zellen mit eiskaltem Ethanol absolut bei -20°C für 5 min. Durch den Wasserentzug werden die Proteine nicht miteinander quervernetzt, so dass eine teilweise Auswaschung von Proteinen aus dem Zellinneren möglich ist, so z.B. nicht membranassoziierte, zytoplasmatisch exprimierte Proteine. Um das zu verhindern, ist eine Fixierung mit 4% Paraformaldehyd (PFA) möglich. Hier werden die Zellen für 5 min bei RT mit 4% PFA fixiert. Durch die Aldehydgruppe werden die Proteine miteinander quervernetzt.

3.6.3 Mikroinjektion in HeLa-Zellen

Die Mikroinjektion und die darauffolgende Beobachtung der Ausbreitung des injizierten Agens in transfizierten Zellen dienen der Charakterisierung von Gap Junction-Kanälen. Dazu sollten die zu untersuchenden Zellen mindestens 2 Tage auf einer 6 cm-Kulturschale kultiviert werden und eine Konfluenz von etwa 80 % aufweisen. Am Untersuchungstag werden die Zellen vorher zweimal mit PBS⁻ gewaschen, anschließend erneut mit Medium überschichtet und bis zur Injektion im Brutschrank kultiviert. Die Mikroinjektionsversuche werden mit dem inversen Mikroskop IM 35 (Zeiss) und der Fluoreszenzeinrichtung HBO 100 W durchgeführt. Die Injektion des Neurobiotins in die Zellen erfolgt durch Iontophorese (20 nA, 2 – 15 sec) mit Hilfe eines Mikromanipulators (Injectman, Eppendorf). Die 6 cm-Kulturschale mit den zu untersuchenden Zellen steht während der Mikroinjektion auf einer beheizbaren Platte (Heizgerät TRZ 3700, Zeiss) und wird so bei annähernd 37 °C gehalten. Da jedoch die pH-Wertänderung nicht unterbunden werden kann, werden die Zellen nach ca. 20 min apoptotisch. Die Kapillaren (Borosilikatglas Kwik-Fil, World Precision Instruments) werden mit beiden Enden in einen horizontalen Kapillarenzieher (P-97, Sutter Instruments) eingespannt. Der Spitzendurchmesser der so gezogenen Kapillaren beträgt etwa 1 – 2 µm. Die Beladung mit der zu injizierenden Neurobiotin-Lösung erfolgt durch eine etwa 5-minütige Inkubation des stumpfen Endes der aufrecht stehenden Kapillare in einem Mikroreaktionsgefäß. Durch Kapillarkräfte füllt sich die gezogene Spitze luftblasenfrei mit der Neurobiotin-Lösung. Anschließend wird diese in der Kapillare mit Hilfe einer Hamiltonspritze mit 1 M KCl-Lösung luftblasenfrei überschichtet. Die beladene Kapillare wird anschließend in einen mit KCl-Lösung gefüllten Mikroelektrodenhalter aus Plexiglas mit einer AgCl-Elektrode (EH-1S, Sachs) eingesetzt. Der Mikroelektrodenhalter wird dann an den Mikromanipulator montiert. Das injizierte Neurobiotin wird indirekt über eine anschließende Färbereaktion nachgewiesen. Um den Injektionserfolg beobachten zu können, enthält die Neurobiotin-Lösung

zusätzlich Rhodamin-Dextran, einen Fluoreszenzfarbstoff, der nicht durch Gap Junction-Kanäle diffundieren kann. Die Injektionen werden mit dem Filter BP 530-585, FT 600, LP 615 verfolgt. Nachdem die Kapillare in die Zelle eingestochen worden ist, erfolgt die Injektion durch Anlegen eines positiven Stroms (20 nA) für etwa 2 – 10 sec. Pro Kulturschale werden 10 Injektionen durchgeführt, um eine statistische Auswertung zu ermöglichen. Nach der letzten Injektion werden die Zellen zweimal mit PBS⁻ gewaschen und anschließend mit 1 ml Glutaraldehyd-Lösung 5 min bei RT fixiert, welches durch dreimaliges Waschen mit PBS⁻ entfernt wird. Anschließend werden die Zellen permeabilisiert, indem sie 2 Stunden bei RT oder ü.N. bei 4 °C in 2 ml Triton X-100-Lösung inkubiert werden. Danach werden die Zellen erneut dreimal mit PBS⁻ gewaschen und mit 1 ml AvidinD-Meerrettich-Peroxidase-Lösung für 90 min bei RT inkubiert. Die nicht gebundene AvidinD-gekoppelte Meerrettich-Peroxidase wird durch dreimaliges Waschen mit PBS⁻ entfernt. Die eigentliche Färbereaktion erfolgt durch eine 30 sekundige Inkubation mit 1 ml DAB-Färbelösung. Sie wird durch Absaugen und dreimaliges Waschen mit PBS⁻ gestoppt. Mit PBS⁻ überschichtete, angefärbte Zellen können unter dem Mikroskop ausgezählt und bei 4 °C gelagert werden.

Wird für die Mikroinjektion der Farbstoff Lucifer Yellow benutzt, wird alles genau so vorbereitet wie oben beschrieben. Dieser Farbstoff wird mit LiCl überschichtet und es wird kein Rhodamin-Dextran hinzugefügt, da Lucifer Yellow selbst ein Fluoreszenzfarbstoff ist. Der Vorteil bei der Verwendung dieses Farbstoffes ist, dass 1 min nach der Injektion ein Bild zur Auswertung der Kopplung der HeLa-Zellen gemacht werden kann, somit also die Auswertung schneller möglich ist.

3.6.4 Proteinanalytik

Proteine sind empfindliche Makromoleküle, die leicht durch Proteinasen abgebaut werden können. Bei der Arbeit mit Proteinen ist daher darauf zu achten, dass sie sich immer auf Eis bzw. bei 4°C in gekühlter Umgebung befinden, um sie vor Abbau zu schützen. Die Versuche sollten möglichst rasch und in Gegenwart von Proteinase-Hemmer durchgeführt werden, um den Verlust von Protein durch Abbau zu minimieren.

3.6.4.1 Herstellung von HeLa-Zell-Lysaten

Die Zellen werden bis zu einer Konfluenz von 85 bis 95 % kultiviert. Nach zwei Waschschritten mit PBS⁻ werden sie auf Eis gestellt, nochmals mit PBS⁻ (4°C) gewaschen und in Schräglage sorgfältig trockengesaugt. Anschließend wird die Kultur in 1 x Complete (Roche), einem Gemisch verschiedener Proteinase-Hemmer, lysiert. Das eingesetzte Volumen des Puffers beträgt 200 µl bei 10 cm-Kulturschalen. Mit Hilfe eines Gummischabers werden die Zellen vom Schalenboden gelöst, das Lysat anschließend in ein Schraubdeckelreaktionsgefäß überführt und mit Hilfe des Ultraschallstabes homogenisiert. Das Lysat ist bei

-70°C lagerbar. Wird mit den Zellen nach den Waschschritten nicht direkt weitergearbeitet, ist eine ein- bis zweiwöchige Lagerung der trockenen und mit Parafilm abgedichteten Kulturschalen bei -20°C möglich.

3.6.4.2 Herstellung von Gewebelysaten

Die Gewebe werden den durch zervikale Dislokation getöteten Mäusen entnommen und in ein Eppendorfschnappdeckelgefäß oder ein Falconröhrchen (15 ml/50 ml) überführt. Mit Hilfe von Plastikhandmörsern werden die Gewebeproben anschließend in RIPA-Puffer mit 1 x Complete™-Lösung zerkleinert. Das entstandene Lysat wird 3 x 30 sec mit dem Ultraschallstab behandelt, für 10 min auf Eis gestellt und schließlich 30 min bei 4°C und 13.000 Upm zentrifugiert. Der Überstand wird vorsichtig abgenommen und in eine neues Reaktionsgefäß überführt. Bei größeren Geweben wird das Gewebe mit einem Homogenisatorstab zerkleinert und danach, wie oben beschrieben, weiter behandelt. Das Lysat ist bei -70°C lagerbar.

3.6.4.3 Bestimmung der Proteinkonzentraion von Proteinlysaten

Eine genaue und zuverlässige Methode der Konzentrationsbestimmung von Proteinlysaten stellt der Bichinonsäure-Assay dar. Das Prinzip beruht auf der Fähigkeit von Proteinen, Kupfersulfat zu reduzieren, welches durch die Bichinonsäure komplexiert wird und einen violetten Komplex mit einem Absorptionsmaximum bei 562 nm ausbildet. Die photometrische Absorption bei 562 nm ist direkt proportional zur Proteinkonzentration. Die Konzentrationsbestimmung erfolgt anhand einer Eichkurve mit Proben bekannter Proteinkonzentration (BSA-Lösung: 0, 20, 40, 60, 80, 100 mg/ml), welche immer direkt vor der Probenmessung erstellt wird.

3.6.4.4 Diskontinuierliche SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese (SDS-PAGE)

Die Methode der SDS-PAGE beruht auf der Wanderung geladener Proteine im elektrischen Feld. Das Detergenz SDS bindet alle 2 Aminosäurereste an hydrophobe Regionen von Proteinen, so dass das Verhältnis von Ladung zu Masse in allen SDS-Proteinkomplexen ungefähr gleicht. So ist auch die Gesamtladung negativ und die Anordnung der Proteine stäbchenförmig. Dadurch werden die aus der Eigenladung der Proteine resultierenden Effekte aufgehoben, die Wanderung der SDS-Proteinkomplexe ist nun von Größe und Form bzw. dem Molekulargewicht abhängig. Das diskontinuierliche Polyacrylamidgel (Laemmli, 1970) besteht aus zwei Teilen unterschiedlicher Zusammensetzung: dem Sammelgel mit einem 4 %igen Acrylamidanteil (AA) und einem pH-Wert von 6,8 und dem Trenngel mit einem 12 %igen AA und einem pH-Wert von 8,8. Im Puffer befindet sich Glyzin, das neben den Chloridionen von entscheidener Bedeutung ist:

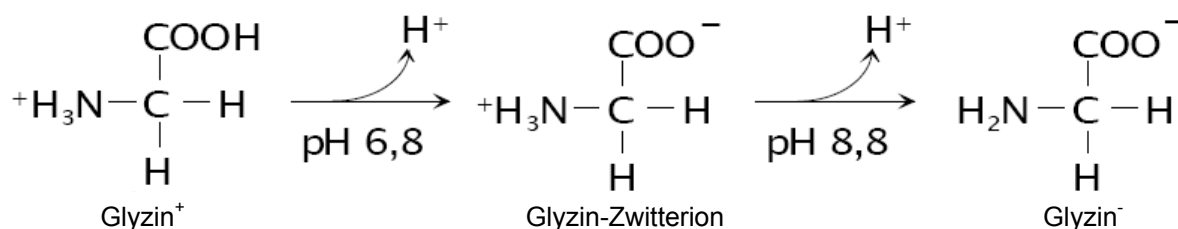


Abb. 3.1: Verhalten des Glyzinions in einer SDS-PAGE. Glyzin-Zwitterion im Sammelgel, Glyzinanion im Trenngel.

Im Sammelgel wandern die Chloridionen schneller als die SDS-Proteinkomplexe, die Glyzin-Zwitterionen langsamer. Daraus resultieren ein erhöhter Spannungsgradient und die Fokussierung der Proteine zwischen den zwei Ionen an der Trenngelfront. Eine Verbesserung der Auflösung des Trenngels wird so sichergestellt. Im Trenngel ist Glyzin negativ geladen, es überholt die Proteine, die nun nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt werden. Die fertig polymerisierten Gele werden in die Elektrophoreseapparatur eingespannt und die Pufferkammern mit 1 x Elektrophorese-Puffer gefüllt. Neben den in 1 x Complete (Roche) und Laemmli-Laufpuffer aufgenommenen Proteinlysaten wird ein Molekulargewichtsstandard auf das Gel aufgetragen. Proteinlysaten wird vor dem Auftragen β -Mercaptoethanol und Bromphenolblau zugefügt. Die unter Wasserkühlung durchgeführte Elektrophorese erfolgt bei 20 mA pro Gel, solange sich die Proben im Sammelgel befinden. Sobald sie das Trenngel erreicht haben, wird auf eine Stromstärke von 25 mA pro Gel erhöht. Die Gele setzen sich aus folgenden Lösungen zusammen:

Zusammensetzung	Sammelgel 4 % AA	Trenngel 12 % AA
Acrylamid	1,3 ml	6,0 ml
Trenngelpuffer (pH 8,8)	-	3,75 ml
Sammelgelpuffer (pH 6,8)	2,5 ml	-
A. bidest	6,25 ml	5,25 ml
APS (10 %)	60 μ l	90 μ l
Temed	6 μ l	9 μ l

Tabelle 3.2: Zusammensetzung von zwei diskontinuierlichen SDS-Gele (nach Laemmli, 1970).

3.6.4.5 Anfärben von SDS-Polyacrylamidgelen mit CoomassieBrilliantBlue™

Ein Gel wird entweder direkt im Anschluss an die SDS-PAGE oder erst nach Durchführung des Transfers von Proteinen auf eine geeignete Membran zum Nachweis der Proteinbanden gefärbt. Ist das gesuchte Protein in großer Menge im Proteinlysate enthalten, wird es anhand seiner Bande identifiziert, die sich auf Höhe der erwarteten molekularen Masse befindet. Dazu wird das Polyacrylamidgel in CoomassieBrilliantBlue™-Lösung (RT, 15 min, Wippe) und danach in mehrfach zu wechselnder Coomassie-Entfärber-Lösung (RT, ü.N., Wippe) inkubiert, so dass die Proteinbanden sichtbar gemacht werden. Die Nachweisgrenze der Proteine liegt bei etwa 50 ng pro Bande.

3.6.4.6 Westernblot

Der Westernblot ermöglicht einen Transfer der durch SDS-PAGE aufgetrennten Proteine auf eine Membran. Dazu wird der größte Teil der Proteine nach der SDS-PAGE durch Anlegen eines elektrischen Feldes aus dem Gel auf eine Nitrozellulose-Membran, welche die Proteine sehr fest bindet, transferiert (Sambrook et al., 1989). Bei jedem Westernblot ist darauf zu achten das keine Luftblasen zwischen den Schichten sind.

3.6.4.6.1 Nassblot

Nach der Gelelektrophorese wird der Nassblot nach dem sogenannten „Sandwichverfahren“ aufgebaut: Schaumstoff, 3MM-Whatmanpapier, Polyacrylamidgel, Hybond-ECL-Nitrozellulosemembran, 3MM-Whatmanpapier, Schaumstoff. Dieses „Sandwich“ wird in die mit 1 x Transferpuffer gefüllte Transferkammer gesetzt. Die Nitrozellulosemembran ist zur Anode hin orientiert. Der Proteintransfer erfolgt bei 4°C, 100 V und 500 mA für 2 h.

3.6.4.6.2 Semi-Dryblot

Das Gel, die Membran und das 5MM-Whatmanpapier werden für 20 min bei RT im SemiDry-Transferpuffer equilibriert, anschließend wird der Semi-Dryblot folgendermaßen aufgebaut: 5MM-Whatmanpapier, Hybond-ECL-Nitrozellulosemembran, Polyacrylamidgel, 5MM-Whatmanpapier. Dieser Aufbau wird in die Semi-Dryblot-Kassette gelegt; der Deckel, der gleichzeitig die Katode bildet, wird auf den Blot gesetzt. Der Proteintransfer erfolgt bei 4°C, 25 V und 600 mA für 30 min.

3.6.4.7 Ponceau-Färbung

Der Nachweis von Proteinen auf der Nitrozellulose-Membran erfolgt reversibel, die Detektionsgrenze liegt bei 100 ng Protein pro Bande. Hiermit wird der Transfer von Proteinen aus dem Polyacrylamidgel auf die Nitrozellulose-Membran nachgewiesen. Dafür wird die Membran für 30-60 sec unter Schwenken in der Ponceau-Färbelösung inkubiert und anschließend die entstandene Hintergrundfärbung mit VE-Wasser entfernt. Die Entfärbung des Proteinbandenmusters erfolgt durch Inkubation der Nitrozellulosemembran in VE-Wasser für 10-20 min, wobei das Wasser häufiger gewechselt wird. Die Entfärbung kann auch direkt mit Blockierungslösung erfolgen.

3.6.4.8 Immunoblot-Analyse mittels Chemilumineszenz (ECL)

Die aus einem Proteingemisch aufgetrennten, gesuchten Proteine, die zuvor mittels Westernblot auf eine Membran transferiert wurden, werden mit Hilfe von spezifischen Anti-

körpern nachgewiesen. Für die Immunoblot-Analyse mit Hilfe der Chemilumineszenz wird das ECL+Plus-Kit oder ECL Femto Sensitive-Kit (Pierce) eingesetzt. Die Nitrozellulosemembran wird zur Absättigung unspezifischer Bindungen der Antikörper in Blockierungslösung für 2 h bei RT oder ü.N. bei 4°C auf einer Wippe inkubiert. Anschließend erfolgt eine Inkubation der Nitrozellulosemembran mit den Primärantikörpern (1 – 2 h, RT). Durch Waschen mit Waschblotpuffer (3 x 5 min, RT) werden die unspezifisch gebundenen Antikörper entfernt. Die Membran wird mit den in Blockierungslösung verdünnten Sekundärantikörpern für 1 h bei RT inkubiert, anschließend werden die unspezifisch gebundenen Antikörper abgewaschen (3 x 5 min, RT). Die Chemilumineszenz-Lösungen werden im Verhältnis 1:1 auf ein Endvolumen von 4 ml gemischt und damit die Membran für 5 min bei RT mit der Proteinseite nach unten inkubiert. Die Membran wird in eine Filmkassette eingelegt. Es folgt die Belichtung eines RX-Films (Kodak) in der Dunkelkammer.

3.6.4.9 Entfernen gebundener Antikörper von der Nitrozellulosemembran

Damit Nitrozellulosemembranen nach einer Immunoblot-Analyse für eine weitere Antikörperbindung wiederverwendet werden können, müssen die bereits gebundenen Antikörper entfernt werden. Hierfür wird das „Restore® Western Blot Stripping Kit“ der Firma Pierce nach Herstellerangaben eingesetzt.

3.7 Indirekte Fluoreszenz-Analysen an Gewebeschnitten

3.7.1 Herstellung von Gefrierschnitten

Die gefrorenen Präparate werden mit Einbettmedium auf dem Objektisch des Gefriermikrotoms fixiert. Die Gewebeschnitte (12 µm) werden bei -20°C Kammertemperatur, einem Schnittwinkel von 10° und einer Objekttemperatur von -19°C hergestellt und auf Objektträger aufgenommen. Diese werden für 30 min bei RT luftgetrocknet; Sie sind bei -70°C lagerbar.

3.7.2 Immunfluoreszenzen an Gefrierschnitten

Die Gewebeschnitte werden für 5 min mit eiskaltem Ethanol (96 %) oder bei RT mit 4 % PFA fixiert, darauffolgend dreimal mit PBS⁻ (5 min, RT) gewaschen, für 1 h bei RT mit Blockierungslösung inkubiert und danach für 2 h bei RT oder ü.N. bei 4°C mit den in Blockierungslösung verdünnten Primärantikörpern inkubiert. Es folgen drei Waschschritte mit PBS⁻ (5 min, RT), die Gewebeschnitte werden daraufhin für 1 h bei RT mit in Blockierungslösung verdünnten Sekundärantikörpern inkubiert. Nach dreimaligem Waschen (je 5 min, RT) mit PBS⁻ kann eine Propidiumiodid-Kernfärbung durchgeführt werden. Hierfür werden die Gefrierschnitte für 30 min mit RNase 2000 (1:100 in PBS⁻) bei RT inkubiert und nach zweimaligem Waschen mit PBS⁻ (je 5 min, RT) für 15 min mit Propidiumiodid in PBS⁻ (1:25.000) inkubiert. Nach drei

Waschschritten (je 5 min, RT) mit PBS⁻ werden die Gewebeschnitte mit Permafluor Mounting Medium versehen und mit einem Deckglas verschlossen.

3.7.3 β -Galaktosidase-Nachweis an Gefrierschnitten

Adulte Mäuse werden entweder durch zervikale Dislokation getötet oder perfundiert. Zur Perfusion wird die Maus durch eine intraperitoneale Xylazin-Ketamin-Injektion betäubt, der Brustraum geöffnet und eine Kanüle in die linke Herzkammer des noch schlagenden Herzens eingeführt. Durch Öffnen des ersten Hahns einer vorbereiteten Perfusionsapparatur werden der Maus zur Gefäßerweiterung etwa 10 ml Perfusions-Lösung appliziert, wobei zu Beginn der rechte Vorhof des Herzens angeschnitten wird, so dass Blut und die Lösung aus dem Tier abfließen können. Anschließend werden durch Schließen des ersten und Öffnen des zweiten Hahns etwa 10 ml 4 % PFA appliziert, wodurch das Gewebe bei einer Inkubation von 5 min fixiert wird. Nach der Perfusion oder der zervikalen Dislokation wird das gewünschte Gewebe präpariert, das Gehirn wird direkt in Tissue-Tec eingebettet mit einem Kryotom geschnitten oder bei -70°C gelagert. Die Schnitte werden nach einem kurzen Auftauen 5 min in LacZ-Fixierlösung, 3 x 5 min in LacZ-Waschlösung und schließlich meist ü.N. bei 37°C in LacZ-Färbelösung inkubiert. Anschließend werden die Schnitte dreimal 5 min mit LacZ-Waschlösung, 1 x 5 min in Eosin-Färbelösung und bis zur gewünschten Eosin-Intensität in Wasser inkubiert. Die luftgetrockneten Schnitte werden mit Entellan eingedeckelt; nach dem Trocknen wird an einem Axiophot die Blaufärbung betrachtet und ggf. mit einer Axio-Cam dokumentiert.

3.8 Arbeiten zur Charakterisierung homolog rekombinierter ES-Zellen

3.8.1 Southernblot-Analyse rekombinanter ES-Klone

Die Southernblot-Analyse ermöglicht eine Untersuchung der ES-Klone auf homologe Rekombination. Hierzu wird die genomische DNS aus den ES-Klonen (siehe Abschnitt 3.1.2.2) enzymatisch so gespalten, dass nach einer Detektion der Banden mit einer passenden Sonde ein Unterschied zwischen dem homolog rekombinierten Allel und dem WT-Allel sichtbar ist. Nachgewiesen wird mit einer internen Sonde, die über die Häufigkeit der Integration des Konstrukts in das Genom Aufschluss gibt, sowie mit einer externen Sonde, die außerhalb des Konstrukts bindet und eine Aussage über die homologe Rekombination zulässt. So werden 10 µl der genomischen DNS ü.N. in einem 50 µl Ansatz mit konzentrierten Enzymen (20 U/µl) verdaut. In einem Konzentrationsabschätzungsgel werden die Intensitäten abgeglichen. Anschließend erfolgt eine Größenfraktionierung im Agarosegel passender Konzentration ü.N. bei 35 V (siehe Abschnitt 3.1.3). Die Spannung richtet sich jedoch nach der Größe der nachzuweisenden Fragmente. Die aufgetrennte DNS

wird mit einem daneben liegenden fluoreszierenden Lineal fotografiert. Diese Methode hilft bei der Orientierung auf der Membran und bei der Abschätzung der Bandengrößen. Der Transfer der DNS auf eine Membran, die Herstellung der radioaktiv markierten Sonde, die Hybridisierung sowie die Detektion der Banden erfolgt wie unter Abschnitt 3.1.4 beschrieben.

3.8.2 Karyotyp-Analyse homolog rekombinierter ES-Zellklone

Da polyploide ES-Zellen den Erhalt keimbahngängiger Chimären negativ beeinflussen, ist es wichtig, dass die Maus-ES-Zellen während der Kultur ihren normalen Karyotyp von 40 Chromosomen beibehalten. Deshalb ist es wichtig, den Karyotyp der zur Blastozysten-Injektion in Frage kommenden Klone zu überprüfen. Dazu werden die Zellen eines konfluenten T25-Kolbens durch eine Inkubation von 50 min (37°C, 5 % CO₂) mit 0,1 µg/ml Demecolcine (2 ml ES-WT-Medium + 40 µl Demecolcine) in der Metaphase der Mitose arretiert. Die Zellen werden anschließend gewaschen, trypsinisiert, in einem 50 ml-Röhrchen pelletiert und durch Klopfen in 1 ml isotonischer KCl-Lösung resuspendiert. Nach Zugabe von weiteren 3 ml isotonischer KCl-Lösung und vorsichtigem Mischen schwellen die Zellen nach 10 min bei RT osmotisch an. Anschließend werden sie wieder sedimentiert (5 min, 800 Upm), der Überstand abgesaugt und das Pellet durch tropfenweise Zugabe von eiskaltem, frisch angesetztem Methanol:Eisessig-Gemisch (3:1) durch Klopfen resuspendiert. Durch eine Inkubation von 5 min bei RT findet eine erste Fixierung statt, die nach einer erneuten Sedimentation (5 min, 1.200 Upm) noch 2 x mit dem Methanol:Eisessig-Gemisch wiederholt wird. Nach der letzten Sedimentation werden die Zellen in 1 ml Methanol:Eisessig-Gemisch aufgenommen und mit einer Pasteurpipette aus 20-30 cm Höhe auf saubere Objektträger aufgetropft. Die Chromosomen werden durch eine Inkubation von 1 min in Giemsa-Färbelösung angefärbt und die Färbung durch zweimaliges Waschen mit Leitungswasser differenziert. Die Objektträger werden nach dem Trocknen an der Luft mit Entellan eingedeckelt. Es werden mindestens 20 auswertbare Chromosomenanhäufungen einzelner mitotisch arretierter Zellen pro ES-Zellklon an einem Zeiss-Axiophot mit Phasenkontrastoptik ausgezählt.

3.9 Zucht und Haltung von Mäusen

Die Mäuse werden in offenen Tierställen bei einem konstanten Licht-Dunkel-Rhythmus von 12:12 Stunden mit Futter und Wasser *ad libitum* gehalten. Für die Bestimmung des embryonalen Entwicklungsstadiums wird von einer Kopulation zur Mitte der Dunkelphase ausgegangen. Verpaarungen werden durch die gemeinsame Haltung eines Männchens mit 1-2 Weibchen in einem Käfig angesetzt. Erfolgreiche Verpaarungen werden zu Beginn der nächsten Lichtphase anhand eines als Vaginalpropf in der Vagina des Weibchens verbliebenen Ejakulats erkannt. Die Mitte der Lichtphase nach der Kopulation wird als 0,5 dpc („dies post coitum“) definiert.

3.9.1 Blastozysteninjektion und Uterustransfer

3.9.1.1 Superovulation

Durch die Hormonbehandlung werden eine vermehrte Follikelreifung und ein koordinierter Eisprung induziert, so dass bis zu 20 Blastozysten aus einem stimulierten Weibchen isoliert werden können. Hierzu werden Weibchen vor Einsetzen des natürlichen Zyklus im Alter von 4 Wochen verwendet. Zur Mitte des Lichtzyklus wird je Weibchen 100 µl FSH-Lösung (5 U) intraperitoneal injiziert. Etwa 47 Stunden später wird der Eisprung durch eine intraperitoneale Injektion von 100 µl hCG-Lösung (5 U) synchron ausgelöst. Anschließend werden die so behandelten Weibchen für eine Verpaarung eingesetzt und der Verpaarungserfolg am nächsten Morgen bestimmt.

3.9.1.2 Blastozysteninjektion und Uterustransfer

Eine detaillierte methodische Beschreibung zur Erzeugung chimärer Mäuse findet sich bei Nagy et al. (2003). Die Injektionen embryonaler Stammzellen mit dem Genotyp Cx43D378stop/+ in Blastozysten sowie der Transfer der manipulierten Blastozysten in die Uteri scheinschwangerer Weibchen wurden in unserer Arbeitsgruppe von der Technischen Assistentin Christine Siegmund durchgeführt. Zur Identifizierung genetisch veränderter Mäuse nach Blastozysteninjektion homolog rekombinierter embryonaler Stammzellen wird häufig die Fellfarbe als genetischer Marker genutzt (Nagy et al., 2003). Wildtyp-ES-Zellen der Linie HM1 (Magin et al., 1992) aus dem Mausstamm 129P2/OlaHsd sind die Ausgangszellen zur Erzeugung der Cx43D378stop/+ ES-Zellen, die im Rahmen dieser Arbeit zur Erzeugung einer Cx43D378stop-Mauslinie verwendet wurden. Mäuse des entsprechenden Stammhintergrundes prägen aufgrund einer Inhibition der Melaninproduktion in den Haarfollikeln die Fellfarbe agouti dominant aus. Die Cx43D378stop/+ ES-Zellen werden in Blastozysten von C57BL/6-Weibchen (Fellfarbe: schwarz) transferiert. Der Beitrag der transferierten ES-Zellen zur Entwicklung der Nachkommen kann anhand des Fellfarbenschimärismus abgeschätzt werden (Anteil agouti an schwarz). Der Beitrag der manipulierten ES-Zellen zur Bildung von Keimzellen wird durch Verpaarung dieser Chimären mit C57BL/6-Mäusen überprüft. Das Auftreten vollständig agoutifarbener Nachkommen weist die Keimbahntransmission nach. Diese Nachkommen werden nach Genotypisierung und Verpaarung mit C57BL/6-Mäusen zur Expansion der neuen Mauslinie eingesetzt.

4 Ergebnisse

Ziel dieser Arbeit war die Erzeugung einer Mauslinie, die ein Cx43-Protein mit einer spezifischen Ablation der ZO-1-Interaktionsdomäne unter Kontrolle des endogenen *Gja1*-Promotors exprimiert. Diese Mauslinie sollte durch Blastozysteninjektion homolog rekombinierter ES-Zellen erzeugt werden. Zur Ablation wurde die ZO-1-Bindedomäne ausgewählt, welche aus den letzten 3 bis 5 Aminosäureresten besteht (Barker et al., 2002; Giepmans et al., 1998; Toyofuku et al., 1998; Lampe persönliche Mitteilung). Die letzten 5 Aminosäurereste (DDLEI) wurden ablatiert, damit eine vollständige Ablation der Interaktionsdomäne gewährleistet ist.

Parallel dazu sollten mehrere Ablationsmutationen des Cx43-Proteins im HeLa-Testsystem stabil exprimiert und analysiert werden. In den erzeugten Cx43-Mutanten sind die Interaktionsdomänen für ZO-1, Tubulin (Giepmans et al., 2001) und CIP85 (Lan et al., 2005) ablatiert worden.

4.1 Erzeugung der Cx43-Deletionsmutanten durch PCR-Mutagenese

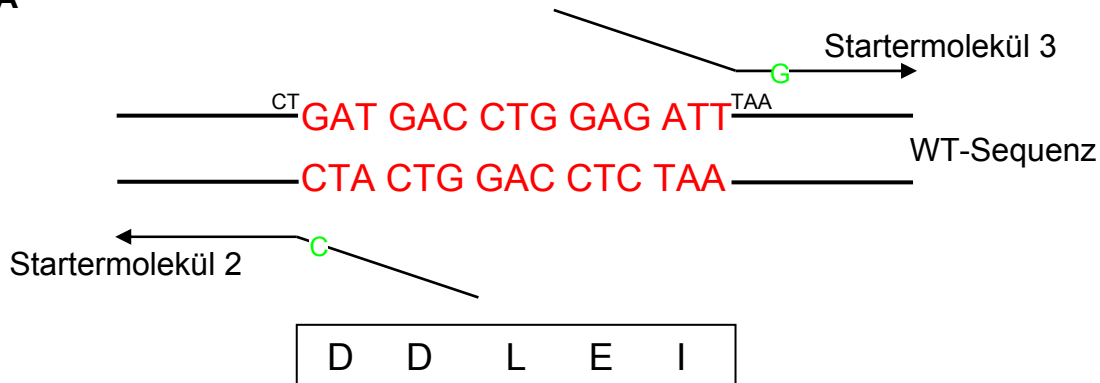
Alle in dieser Arbeit erzeugten Deletionsmutanten wurden mit Hilfe der PCR-Mutagenese hergestellt. Diese PCR besteht aus drei verschiedenen PCR-Schritten (siehe Abb. 4.1). Als Matrize für die ersten beiden PCR-Schritte diente das *Gja1*-Gen, zur Amplifikation wurde die *Taq*-Polymerase benutzt. Diese besitzt keine Korrekturlesefunktion, was für die PCR-Schritte I und II von Bedeutung ist, da durch die Verwendung der Startermoleküle 2 und 3 absichtliche Veränderungen im Vergleich zur Wildtypsequenz eingefügt wurden. Für die PCR III wurde die *PWO*-Polymerase verwendet, um durch deren Korrekturlesefunktion zufällige Mutationen zu verhindern. Die sogenannte 3'-5'-Exonukleaseaktivität (Korrekturlesefunktion) ist dabei in der Lage, Fehlpaarungen zu erkennen und zu korrigieren. Den Ansätzen wurden jeweils die Startermoleküle 1 und 4 hinzugefügt, so dass ein Amplikon von 2,3 kb entstand. Beide Startermoleküle waren für alle 3 erzeugten Deletionsmutanten identisch und sie besaßen 3' und 5' eine *EcoRI*-Schnittstellen-Erkennungssequenz, die später zur Klonierung verwendet werden sollte. Schematisch wird die PCR-Mutagenese am Beispiel der Cx43D378stop-Mutation erläutert (siehe Abb. 4.1), auf Abweichungen wird bei der Beschreibung der jeweiligen Deletionsmutante eingegangen.

4.1.1 Erzeugung der Cx43D378stop-Mutation

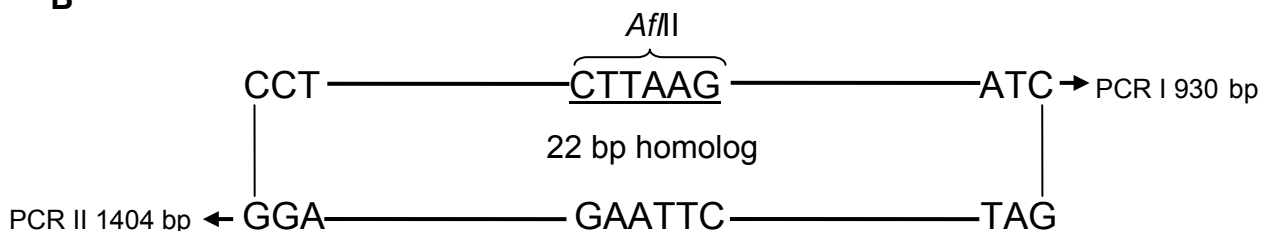
Zur Erzeugung der Cx43D378stop-Mutation wurden 3 PCR-Schritte durchgeführt. Bei der PCR-Mutagenese wurde die DNS der letzten 5 Aminosäurereste („AS“) des Cx43-Proteins ablatiert, dies sind die AS: DDLEI. Neben der Deletion der entsprechenden 15 Basen wurde 3' zusätzlich eine Punktmutation eingefügt. Direkt nach dem Stopcodon (TAA) wurde ein

zusätzliches G inseriert (siehe Abb. 4.1 A). Die dadurch erzeugte künstliche *Afl*I-Schnittstelle (CTTAAG) sollte später zur Klonierung und zur zusätzlichen Kontrolle bei Restriktionsanalysen benutzt werden, da diese Schnittstelle in der *Gja1*-Sequenz nicht enthalten ist.

A



B



C

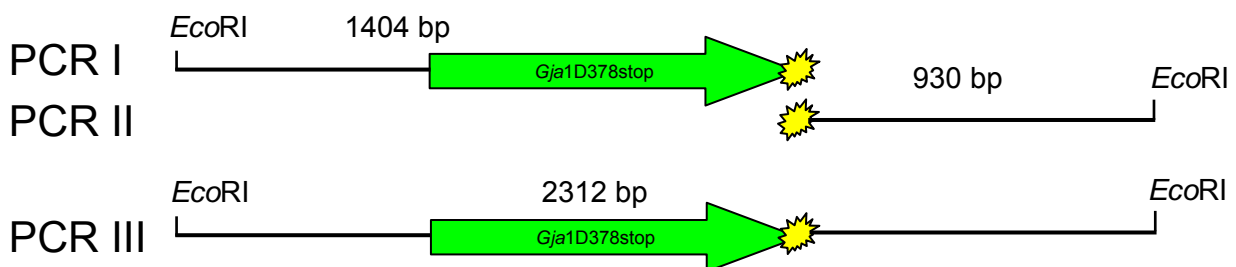


Abb. 4.1: PCR-Mutagenese zur Erzeugung der Cx43D378stop-Mutation und schematische Darstellung der PCR-Reaktionen zur Erzeugung der Deletionsmutante. A: In Rot sind die 15 Basen dargestellt, die durch die PCR-Reaktionen deletiert wurden, im Kasten darunter die durch diese Basen kodierten AS. In Grün ist die jeweils eingefügte Base G bzw. C in den Startermolekülen 2 bzw. 3 angegeben, um eine *Afl*I-Schnittstelle zu erzeugen. B: Die PCR-Produkte I und II hatten jeweils einen 22 bp langen Abschnitt, in dem sie homolog zueinander waren und sich über diesen aneinander lagern konnten. So wurden für die PCR III nur noch die Startermoleküle 1 und 4 benötigt, um ein Fusionsprodukt der PCR-Produkte I und II zu erzeugen. C: Darstellung der PCR-Ergebnisse mit den eingefügten *Eco*RI-Schnittstellen. In Grün ist die für *Gja1*D378stop kodierende mutierte Sequenz und in Gelb die Stelle der Deletion sowie der homologen Bereiche der PCR Produkte I und II dargestellt. Verwendete Startermoleküle: Startermolekül 1 = *Eco*RI/Cx43_vorHincII; Startermolekül 2 = Cx43delCT_5AS_rev; Startermolekül 3 = Cx43delCT_5AS_for; Startermolekül 4 = Cx43_3'UTR_*Eco*RI.

Nach einer Restriktionsspaltung mit Restriktionsenzymen und anschließender Agarosegelelektrophorese ist eine Deletion von 15 Basen in einer mutierten DNS normalerweise nur sehr schwer von einer WT-DNS zu unterscheiden. Durch das Einfügen der zusätzlichen Schnittstelle war dies nun möglich.

Bei der PCR I entstand ein Amplikon mit 1.404 Basenpaaren (bp). Dieses enthielt den untranslatierten 5'-Bereich des *Gja1*-Gens direkt vor der kodierenden Region und die kodierende Region von *Gja1* – bis auf die letzten 15 Basen, welche die potenzielle ZO-1-Bindedomäne des Cx43 kodieren. Die PCR II ergab ein Amplikon von 930 bp und enthielt den auf die kodierende Region folgenden untranslatierten 3'-Bereich des *Gja1*-Gens. Die PCR-Produkte wurden so gewählt, dass 22 homologe Basenpaare entstanden, an denen sich die PCR-Produkte I und II aneinander anlagern konnten (siehe Abb. 4.1 B). Zusätzlich zu den PCR-Produkten I und II wurden bei der PCR III die Startermoleküle 1 und 4 zugefügt, so dass ein Amplikon von 2.312 bp Länge entstand (siehe Abb. 4.1 C).

Dieses PCR-Amplikon sollte mit *EcoRI* gespalten und in den zuvor ebenfalls mit *EcoRI* linearisierten Vektor pBSKdelta*Clal* inseriert werden. Später wurde das unverdaute Amplikon in den pGem-Teasy-Vektor inseriert. Dieser Vektor besitzt zwei *EcoRI*-Schnittstellen in der Multiplen Klonierungsstelle, die statt der eingefügten Schnittstellen verwendet werden konnten. Der gewonnene Vektor TeasydZO-1 wurde sequenziert. Das Ergebnis bestätigte die Deletion der gewünschten 15 Basen sowie die Einführung der zusätzlichen Base (mutierte Sequenz im Anhang). Zudem lag keine Mutation in den eingebrachten *EcoRI*-Schnittstellen vor. Um zu überprüfen, ob das Amplikon in den Teasy-Vektor inserierte, wurde der Vektor mit *EcoRI* gespalten, (siehe Abb. 4.2). Dabei entstanden zwei Fragmente: das größere Fragment ist das pGem-Teasy-Vektorrückgrat (3 kb), das kleinere das eingefügte *Gja1*D378stop-Insert (2,3 kb).

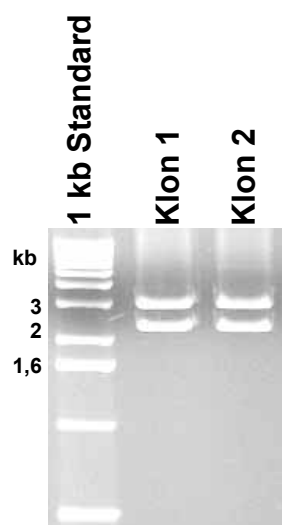


Abb. 4.2: Spaltung des TeasydZO-1-Vektors mit *EcoRI* am Beispiel von zwei Klonen. Die erwarteten zwei Fragmente sind zu sehen: das 3 kb-Fragment ist das Teasy-Rückgrat, die 2,3 kb-Bande das *Gja1*D378stop-Insert. Beide Klone sind positiv.

Die durch die Sequenzierung und die Restriktionsenzymanalyse bestätigte Sequenz wurde für die Klonierung des HeLa- und des KI-Vektors weiter verwendet.

4.1.2 Erzeugung der Cx43_(Δ234-243)-Mutation zur Ablation der Tubulin-Interaktionsdomäne des Cx43-Proteins

Die Erzeugung der Cx43_(Δ234-243)-Mutation erfolgte im Ablauf analog zur Erzeugung der Cx43D378stop-Mutation (siehe Abschnitt 4.1.1). Die AS 234 - 243 (KGVKDRVKGR) bilden die Tubulin-Proteininteraktionsdomäne des Cx43 (Giepmans et al., 2001). Deshalb wurden die entsprechenden 30 Basen deletiert (mutierte Sequenz: siehe Anhang). In diesem Fall hatten die PCR-Produkte folgende Längen: PCR I 1,35 kb, PCR II 0,95 kb und PCR III 2,3 kb. Da sich die deletierten Basen innerhalb der kodierenden Sequenz befanden, konnte keine zusätzliche Schnittstelle durch Punktmutation eingefügt werden, ohne das Leseraster zu zerstören. Nach der Insertion des PCR III-Produktes in den pGemTeasy-Vektor wurde dieser sequenziert. Da die Sequenzanalyse keinerlei unerwünschte Mutationen zeigte, wurde der Vektor zur Klonierung des HeLa-Cx43_(Δ234-243)-Expressionsvektors verwendet.

4.1.3 Erzeugung der Cx43_(Δ253-256)-Mutation zur Ablation der CIP85-Interaktionsdomäne des Cx43-Proteins

Die AS 253 - 256 (PLSP) bilden die CIP85-Proteininteraktionsdomäne des Cx43 (Lan et al., 2005). Um deren Funktion zu untersuchen wurden die entsprechenden 12 Basen deletiert (mutierte Sequenz: siehe Anhang). Die Erzeugung der Cx43_(Δ253-256)-Mutation erfolgte analog der Cx43D378stop-Mutation (siehe Abschnitt 4.1.1). Die drei erzeugten PCR-Produkte hatten folgende Längen: PCR I 1,35 kb, PCR II 0,95 kb und PCR III 2,3 kb. Da sich die Cx43_(Δ253-256)-Mutation innerhalb der kodierenden Region befand, konnten keine zusätzlichen Schnittstellen eingefügt werden, da hierdurch das Leseraster zerstört worden wäre. Nach der Insertion des PCR III-Produktes in den pGemTeasy-Vektor wurde dieser sequenziert und anschließend zur Erzeugung des HeLa-Cx43_(Δ253-256)-Expressionsvektors benutzt.

4.1.4 Datenbankanalyse der verschiedenen Deletionsmutanten

Mit Hilfe der von HUSAR (Heidelberg Unix Sequences Analysis Resource) bereitgestellten Analysewerkzeuge wurden die verschiedenen Deletionsmutanten genauer analysiert.

Die theoretische Molekularmasse einer Aminosäuresequenz kann mittels des Befehls „pepstats“ ermittelt werden. Tabelle 4.1 zeigt eine Übersicht der errechneten molekularen Massen in kDa.

Mit dem HUSAR-Befehl „tmhmm“ wurde untersucht, ob sich durch die Ablationen die Verteilung der topologischen Domänen (zytoplasmatisch, membranständig, extrazellulär)

verändert hat. Dies war für alle in dieser Arbeit hergestellten Ablationsmutanten nicht der Fall.

Ablationsmutante	Anzahl der AS	Molekuarmasse (kDa)
Cx43WT	382	43,01
Cx43D378stop	377	42,43
Cx43 _(Δ234-243)	372	41,89
Cx43 _(Δ253-256)	378	42,62
Cx43K258stop	257	29,45

Tabelle 4.1: Molekularmassen und Anzahl der AS der verschiedenen in dieser Arbeit verwendeten (Cx43WT, Cx43K258stop) und hergestellten (Cx43D378stop, Cx43_(Δ234-243), Cx43_(Δ253-256)) Versionen des Cx43-Proteins.

Mit dem Befehl „motifs“ können theoretische Ansatzpunkte für Proteinkinasen und andere Enzyme ermittelt werden. Für die Mutationen Cx43D378stop und Cx43_(Δ234-243) wurden keinerlei Veränderungen festgestellt. Im Fall der Cx43_(Δ253-256)-Mutation wurde der Verlust einer putativen Phosphorylierungsstelle der Proteinkinase C am Serin 255 des Cx43WT-Proteins vorhergesagt. In der Literatur sind für die Phosphorylierung dieses Serins zwei Kinasen beschrieben, die MAPK (Warn-Cramer et al. 1996) und CDC2 (Kanemitsu et al., 1998; Lampe et al., 2000). Beide Kinasen können das Cx43 direkt phosphorylieren und üben dadurch einen negativen Einfluss auf die Kommunikation von Gap Junctions aus. Die Phosphorylierung durch CDC2 führt zur Internalisierung von Cx43 zu Beginn der Mitose, während die Phosphorylierung durch die MAPK zu einem Schließen der Gap Junction-Kanäle führt (Pahujaa et al., 2007).

4.2 Erzeugung und Charakterisierung der Cx43-Deletionsmutanten

4.2.1 Klonierung der HeLa-Vektoren

Die hinter den Plasmiden stehenden Nummern beziehen sich auf die Beschriftung in Abbildung 4.3 (und Abbildung 4.4 im Falle von (1) und (2)). Zur Erzeugung der HeLa-Vektoren wurden die unter 4.1 beschriebenen mutierten *Gja1*-Sequenzen verwendet. Anschließend wurden die PCR-Produkte mit den entsprechenden Deletionen (1) in den pGem-Teasy-Vektor (2) einkloniert und von dort in einem Schritt in einen HeLa-Vektor kloniert. Dieser beinhaltet eine Resistenzkassette zur Selektion in eukaryotischen Zellen und einen in Eukaryoten aktiven Viruspromotor vor der jeweiligen eingebrachten Mutation.

4.2.1.1 Klonierung des Cx43D378stop HeLa-Vektors

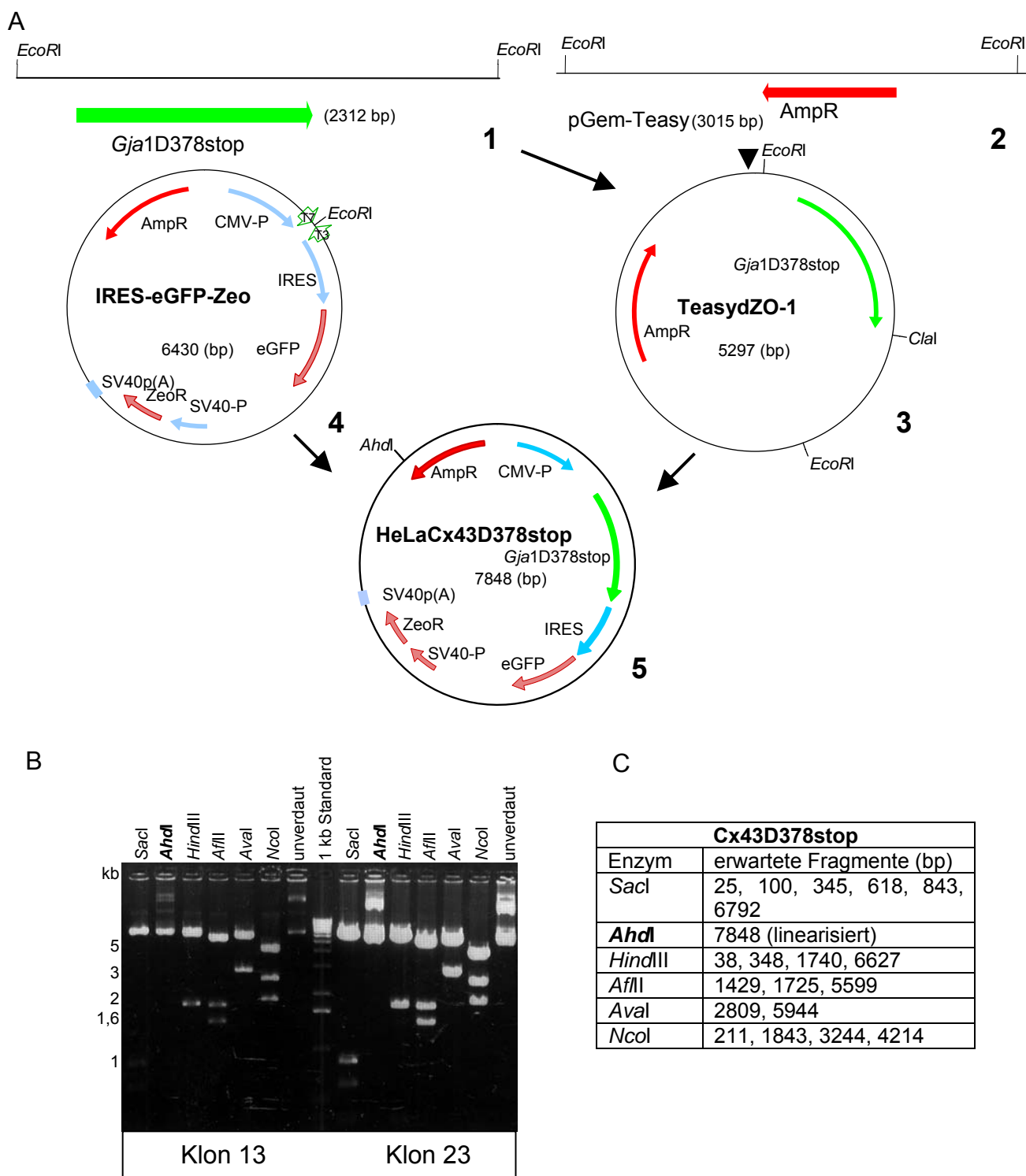


Abb. 4.3: Klonierung und Restriktionsanalyse des Cx43D378stop-HeLa-Vektors. A: Klonierungsschema des Cx43D378stop-HeLa-Vektors. B: Restriktionsanalyse mit verschiedenen Restriktionsenzymen, um die erfolgreiche Einklonierung der Gja1D378stop-Sequenz zu überprüfen. C: Tabelle mit den durch die Restriktionsspaltung erwarteten Fragmenten.

Schritt 1: Das PCR-Produkt *Gja1D378stop* (1) wurde in den linearisierten pGem-Teasy-Vektor (2) eingebracht.

Schritt 2: Aus dem TeasydZO-1-Vektor (3) wurde das Insert (1,45 kb) ausgeschnitten (*EcoRI*, *ClaI*), da der Abstand zwischen IRES und dem darauf folgenden Gen zwischen 50 und 150 bp betragen soll (Attal et al., 1999). Anschließend wurde es in den IRES-eGFP-Zeo-Vektor (4) (*EcoRI*) eingebracht. Dadurch wurde der Endvektor HeLaCx43D378stop (5) erzeugt, der für die Transfektion der HeLa-Zellen benutzt wurde.

Alle erwarteten Fragmente konnten nach der Restriktionsspaltung bestätigt werden, so dass einer der Klone (Klon 13) zur Transfektion der HeLaWT-Zellen verwendet werden konnte. Die Transfektion erfolgte wie im Abschnitt 3.5.1.3 beschrieben; zur Linearisierung des HeLa-Vektors wurde *AhdI* verwendet.

4.2.1.2 Klonierung der Cx43_(Δ234-243)- und Cx43_(Δ253-256)-HeLa-Vektoren

Bei der Verwendung von Zeozin treten häufiger DNS-Strangbrüche auf (Hwang et al., 2005, Chankova et al., 2007), außerdem ist das Wachstum der Klone erheblich verlangsamt, was zu einer Verzögerung der Analyse der Klone führt. Vermutlich führte die Selektion mit dem Zeozin deshalb nicht zum erwünschten Ergebnis. Aus diesem Grund wurden die anderen Cx43-Mutationen in einen HeLa-Vektor kloniert, der eine andere Antibiotikaresistenz, in diesem Fall gegen Blastizidin, besaß.

Schritt 1: Die PCR-Produkte (Cx43_(Δ234-243) bzw. _(Δ253-256)) (1) wurden in den pGem-Teasy-Vektor (2) einkloniert.

Schritt 2: Aus dem dadurch entstehenden TeasyMut (3) wurde das Insert (1,45 kb) (*EcoRI*, *ClaI*) ausgeschnitten und in den IRES-eGFP-Zeo (4) (*EcoRI*) eingebracht. Dadurch wurden die Vektoren HeLaCx43Mut (5) gewonnen.

Schritt 3: Um die oben beschriebenen Probleme mit der Zeozinresistenz zu umgehen, wurde der *Gja1*Mut-IRES-eGFP-Bereich (*AflI*, *XbaI*) ausgeschnitten und in den SV40BlastCMV-Vektor (6) (*BamHI*, *HindIII*) einkloniert. Dadurch wurden die entsprechenden Endvektoren (7) (HeLaCx43_(Δ234-243) und HeLaCx43_(Δ253-256)) gewonnen, die zur Transfektion von HeLaWT-Zellen benutzt wurden.

Die HeLa-Vektoren bestehen aus dem CMV-Promotor, den *Gja1*-Mutationen Cx43_(Δ234-243) oder Cx43_(Δ253-256), gefolgt von der IRES-Sequenz und dem eGFP-Gen. Das Blastizidin-Resistenzgen steht unter der Kontrolle des SV40-Promotors. Die klonierten Endvektoren wurden verschiedenen Restriktionsanalyse unterzogen.

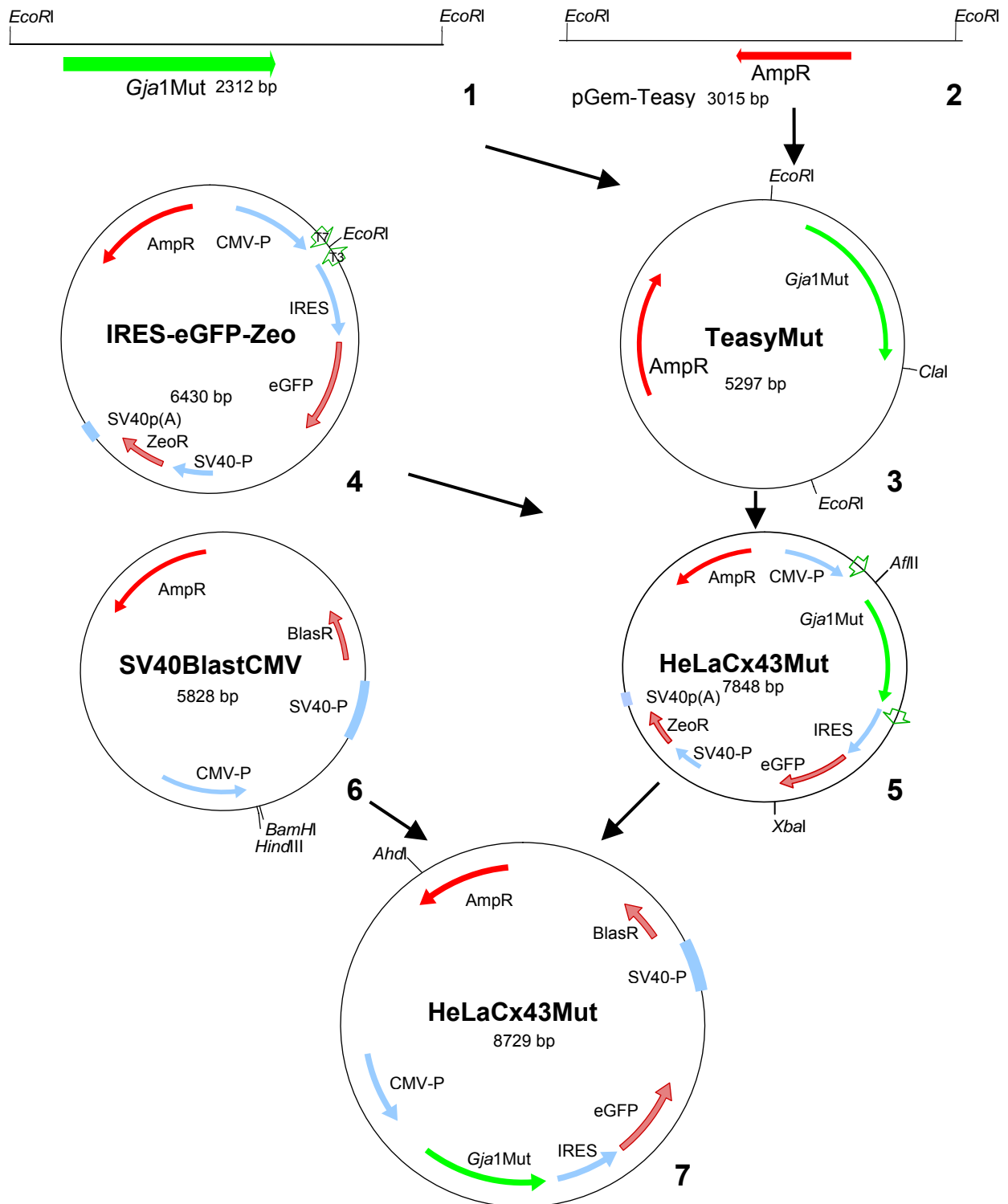


Abb. 4.4: Klonierung der HeLaCx43_(Δ234-243)- und HeLaCx43_(Δ253-256)-Vektoren (hier als HeLaCx43Mut bezeichnet). Die bei den einzelnen Schritten während der Klonierung verwendeten Restriktionsenzyme sowie das zur Linearisierung verwendete Enzym *AhdI* sind in den entsprechenden Vektorkarten eingezeichnet.

Durch die Restriktionsanalyse der Cx43_(Δ234-243)- und Cx43_(Δ253-256)-Klone wurden die Vektoren bestätigt. Nach der anschließenden Sequenzierung wurden die Klone, nachdem sie unter

Verwendung des Enzyms *AhdI* linearisiert worden waren, zur Transfektion der HeLaWT-Zellen verwendet.

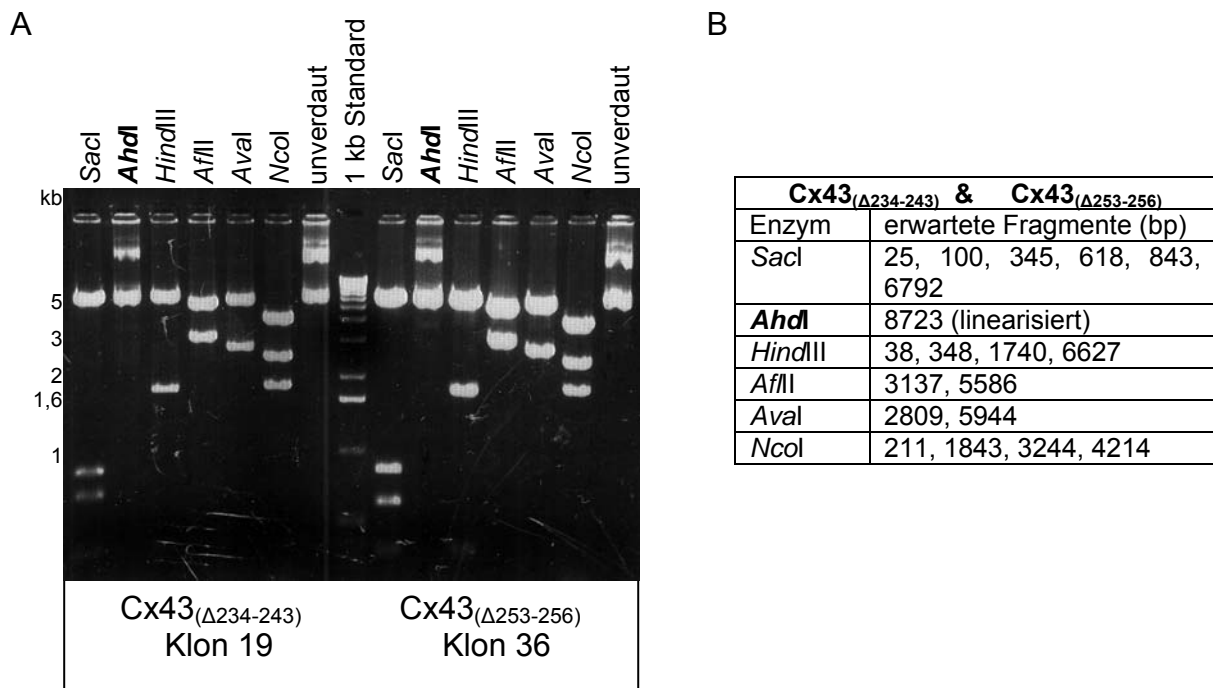


Abb. 4.5: Restriktionsanalyse des Cx43_(Δ234-243)- und des Cx43_(Δ253-256)-HeLa-Vektors. A: Restriktionsanalyse von Klon 19 der Cx43_(Δ234-243) und von Klon 36 der Cx43_(Δ253-256) Mutation mit mehreren Restriktionsenzymen. B: Tabelle der in der Restriktionsanalyse verwendeten Enzyme und die dadurch zu erwartenden Fragmente.

4.2.2 Nachweis des verstärkten grün fluoreszierenden Proteins („eGFP“) in transfizierten HeLa-Zellen

Das verstärkt grün fluoreszierende Protein („eGFP“) wurde eingesetzt, um die Zellen, welche die Ablationsmutanten von Cx43 exprimierten, visuell zu identifizieren. Es sollten nur die Zellen eine eGFP-Expression ausweisen, die aufgrund einer erfolgreichen transienten Transfektionen auch die veränderten Cx43 Proteine exprimierten. Bei einer Selektion stabiler Transfektanten mit Hilfe der eGFP-Expression wurden ausschließlich Klone selektioniert, die zwar stabil eGFP exprimierten, aber kein, weder durch Immunfluoreszenz oder Immunoblot nachgewiesenes Cx43 Protein.

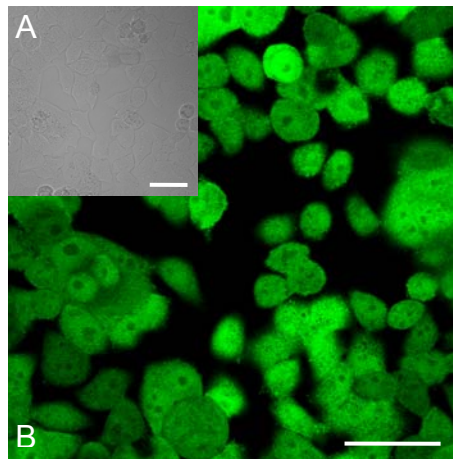


Abb. 4.6: Homogene Expression von eGFP im Klon 76 einer stabilen Cx43D378stop-Transfektion. In diesem Klon konnte kein Cx43D378stop-Protein nachgewiesen werden (Größenstandard = 50 μ m). A: Durchlichtaufnahme, B: eGFP-Fluoreszenz.

4.2.3 Indirekte Immunfluoreszenz der HeLa-Cx43-Ablationsmutanten

Nachfolgend wurde die Selektion mit Blastizidin durchgeführt. Dabei wurde nicht auf die eGFP-, sondern auf Cx43-Expression selektioniert, die mit Hilfe von Immunfluoreszenzen nachgewiesen wurde. Durch die Immunfluoreszenz sollte nicht nur die Expression des mutierten Cx43 nachgewiesen werden, sondern auch die Lokalisation in den HeLa-Zellen untersucht werden. Bei der Cx43D378stop-Mutation konnte davon ausgegangen werden, dass sie zur Membran gelangt, da auch die Cx43K258stop Mutation (Maass, Doktorarbeit 2004) in die Membran inseriert. Um diese Mutation nachzuweisen wurden Cx43-Antikörper (AK) benutzt, die gegen die zytoplasmatische Schleife gerichtet ist (Yeager et al., 1992). Antikörper, die gegen den C-Terminus gerichtet sind, detektierten weder in der Immunfluoreszenz, noch im Westernblot ein Signal für Cx43 (ohne Abbildung). Für die Ablationsmutanten Cx43 $_{(\Delta 234-243)}$ und Cx43 $_{(\Delta 253-256)}$ sowie für das Cx43WT-Protein wurden Cx43-Antikörper verwendet (Schlieker, 2000), die gegen den C-Terminus gerichtet waren. Dass die Cx43 $_{(\Delta 234-243)}$ -Mutation zur Plasmamembran gelangt und dort in die Membran inseriert, war nicht zu erwarten, da der Transport von Cx43 zur Membran über die Verbindung zum Mikrotubulizytoskelett erfolgt. Bei der Cx43 $_{(\Delta 253-256)}$ -Mutation wurde daher eine normale Lokalisation in der Plasmamembran erwartet.

Durch die Immunfluoreszenzanalyse der verschiedenen Cx43-Ablationsmutanten konnte jedoch gezeigt werden, dass die mutierten Proteine im Fall der Cx43D378stop- und der Cx43 $_{(\Delta 253-256)}$ -Mutation in die Membran inserierten und Gap Junction-Plaques ähnlichen Strukturen bildeten. Während bei der Cx43 $_{(\Delta 253-256)}$ -Mutation ein Teil des Proteins zytoplasmatisch lokalisiert ist, ließen sich bei dem ausschließlich zytoplasmatisch lokalisierten Cx43 $_{(\Delta 234-243)}$ -Protein an den Kontaktmembranen der Zellen keine Gap Junction-Plaques ähnlichen Strukturen beobachten. Ob sich eventuell einzelne Proteine in die Membran einlagerten, ohne

dass es zu einer Bildung von Plaque ähnlichen Strukturen kam, konnte durch Lichtmikroskopische Analysen nicht weiter bestimmt werden.

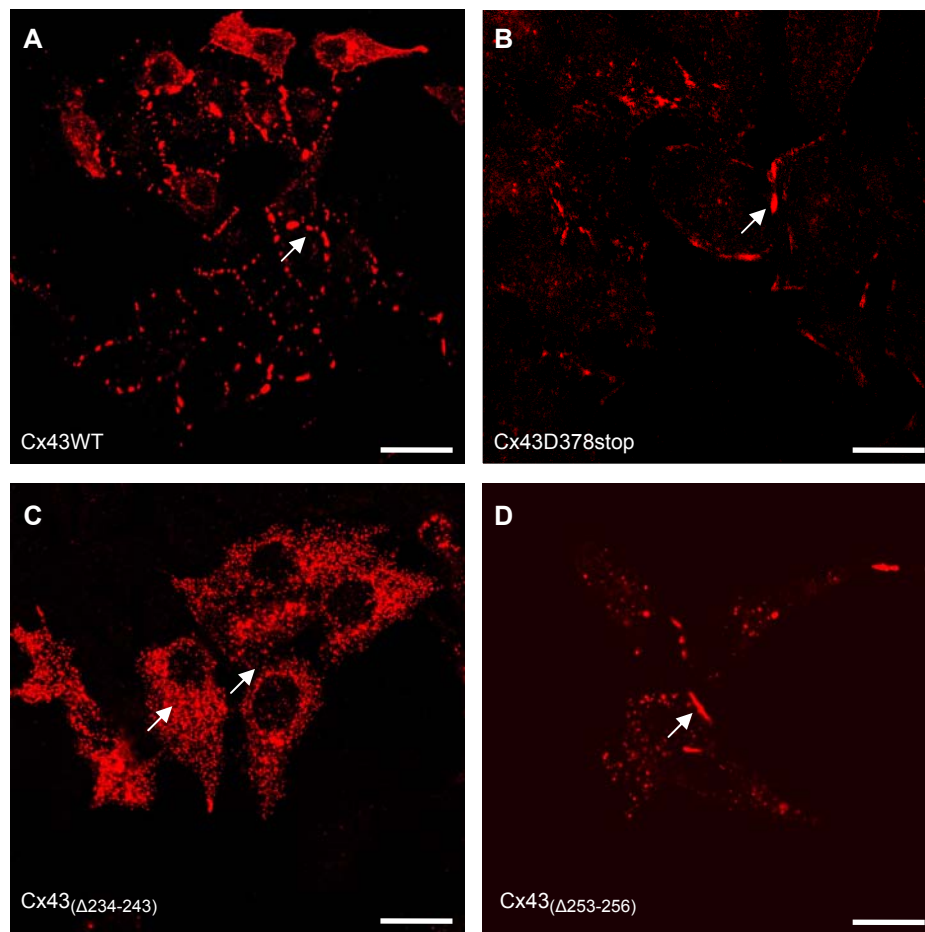


Abb. 4.7: Cx43 Immunfluoreszenzen der verschiedenen HeLa-Zell-Linien. A: In HeLa-Cx43WT-Zellen sind die Gap Junction-Plaques (Pfeil/rot) deutlich zu erkennen. B: In HeLa-Cx43D378stop-Zellen inserierte das mutierte Protein in der Membran (Pfeil/rot) und bildete dort Gap Junction-Plaque ähnliche Strukturen aus. C: In HeLa-Cx43 $_{(\Delta 234-243)}$ -Zellen ist Cx43 nur zytoplasmatisch zu finden und es sind keine Gap Junction-Plaque ähnlichen Strukturen an den Kontaktmembranen zu erkennen (Pfeile/rot). D: In HeLa-Cx43 $_{(\Delta 253-256)}$ -Zellen sind Gap Junction-Plaque ähnliche Strukturen (Pfeil/rot) in den Membranen zu finden, aber es ist im Vergleich zu HeLa-Cx43WT und HeLa-Cx43D378stop-Zellen mehr zytoplasmatisch lokalisiert (Größenstandard = 20 μm /sekundäre Antikörper an Alexa 594 gekoppelt).

4.2.3.1 Doppelimmunfluoreszenzanalyse von HeLa-Cx43WT-Zellen

Um zu prüfen, ob ZO-1 in ausreichender Menge in HeLa-Zellen exprimiert wird, und ob es auch hier mit Cx43 kolokalisiert, wurde eine Doppelimmunfluoreszenz durchgeführt. Dabei wurde für Cx43 der Antikörper gegen die zytoplasmatische Schleife verwendet, für den Nachweis von ZO-1 wurden kommerzielle Antikörper der Firma Zymed verwendet.

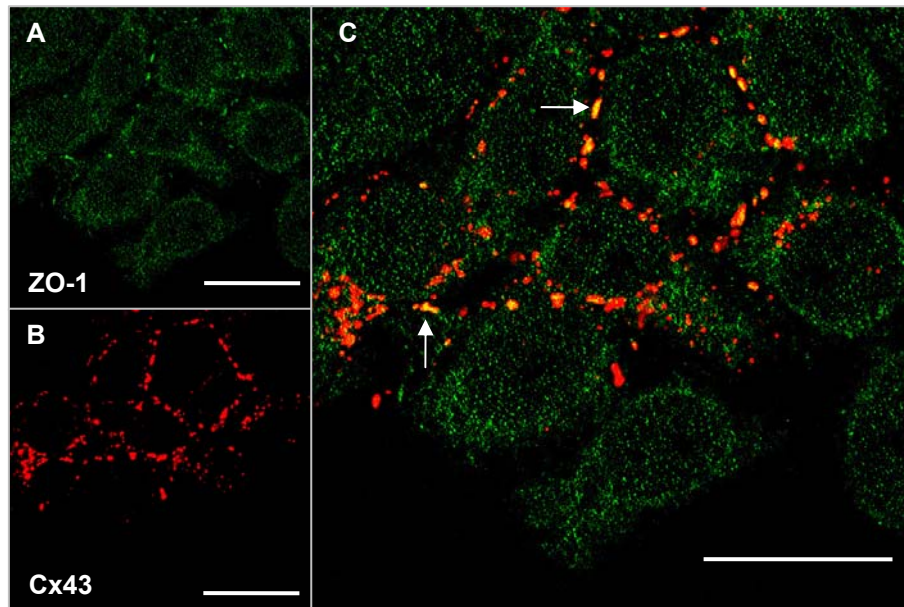


Abb. 4.8: Immunfluoreszenzanalyse von HeLa-Cx43WT-Zellen. A: ZO-1 (grün) ist in der Zelle ubiquitär zu finden, allerdings gibt es auch Ansammlungen in den Kontaktmembranen benachbarter Zellen. B: Cx43 (rot) ist in Plaques in den Kontaktmembranen zu finden. C: Die Überlagerung der beiden Bilder zeigt stellenweise eine Kolokalisation von ZO-1 und Cx43 (gelb/Pfeile)(Größenstandard = 10 µm).

Durch die Doppelimmunfluoreszenz von ZO-1 und Cx43 konnte gezeigt werden, dass beide Proteine auch in HeLa-Zellen kolokalisieren.

4.2.4 Immunoblotanalyse der verschiedenen Cx43-Ablationsmutanten

Um zu überprüfen, ob die verschiedenen Ablationsmutanten auch im Immunoblot nachgewiesen werden können, wurden Lysate der entsprechenden HeLa-Zellen angefertigt. Als primärer Antikörper wurden Cx43-Antikörper (Diplomarbeit Schlieker, 2000) verwendet. Der anschließend auf der gleichen Membran durchgeführte Tubulinabgleich diente der Kontrolle darüber, ob von jedem Lysat die gleiche Proteinmenge aufgetragen wurde.

Ob bei den beiden untersuchten Ablationsmutanten Cx43_(Δ234-243) und Cx43_(Δ253-256) beide Phosphorylierungsstufen (P1 und P2) vorhanden sind, lässt sich nicht eindeutig beantworten, da die Signale vor allem für den P2-Zustand sehr schwach sind. Es scheint zumindest eine Reduktion der P1- und P2-Zustände bei beiden untersuchten Mutanten zu geben. Die niedrigere Lauffront der mutierten Proteine im Vergleich zum Cx43WT-Protein könnten durch eine geringere Phosphorylierung verursacht werden.

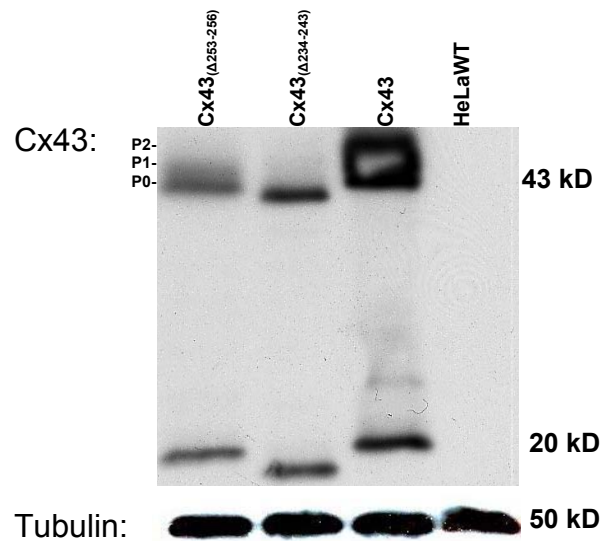


Abb. 4.9: Immunoblotanalyse von Proteinlysaten aus HeLaWT-, HeLaCx43-, HeLa Cx43 $_{(\Delta 234-243)}$ - und HeLa Cx43 $_{(\Delta 253-256)}$ -Zellen. Die beiden Mutationen Cx43 $_{(\Delta 234-243)}$ und Cx43 $_{(\Delta 253-256)}$ können nachgewiesen werden. Es ist zu erkennen, dass sie eine geringere molekulare Masse haben. Der Tubulinabgleich zeigt, dass überall dieselbe Proteinmenge eingesetzt wurde. Die Zellen exprimieren unterschiedliche Mengen der Cx43-Proteine, die Verhältnisse nicht quantifiziert.

Neben den in Abb. 4.9 getesteten Proteinen sollten die beiden Mutanten Cx43D378stop und Cx43K258stop mit Hilfe von Antikörpern nachgewiesen werden. Dazu wurden andere Antikörper verwendet (Cx43 NT1, FHCRC), die gegen den N-Terminus von Cx43 gerichtet sind und diese Mutationen detektieren können. Um die entsprechenden Lysate zu gewinnen, wurden HeLa-Zellen mit den entsprechenden Plasmiden transient transfiziert und die Lysate nach 3 Tagen hergestellt.

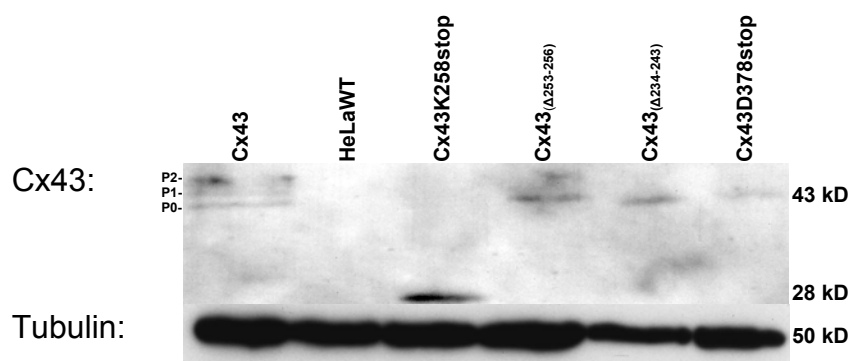


Abb. 4.10: Immunoblotanalyse verschiedener HeLaCx43-Ablationsmutanten mit den Cx43-NT1-Antikörpern. Diese Antikörper erkennen alle Formen des Cx43-Proteins, können also für weitere Analysen benutzt werden. Der Tubulinabgleich zeigt die Beladung des Gels mit einer gleichen Proteinmenge.

4.2.5 Funktionsanalyse der Gap Junction-Kanäle mit Hilfe der Mikroinjektion

Um die Funktion der Gap Junction-Kanäle, die aus den Cx43_(Δ234-243)- und Cx43_(Δ253-256)-Proteinen bestehen, zu analysieren, wurde die Mikroinjektion mit zwei verschiedenen Farbstoffen durchgeführt. Es wurden die Farbstoffe Lucifer Yellow (Ladung: -2, 443 Da) und Neurobiotin (Ladung: +1, 287 Da) verwendet. Die Injektion in HeLa-Cx43WT-Zellen diente als Positivkontrolle und lieferte den Vergleichswert mit den mutierten Cx43-Proteinen.

Als Negativkontrolle wurden HeLaWT-Zellen benutzt, da sie kopplungsdefizient sind (Elfgang et al., 1995). Um das Ergebnis statistisch auswerten zu können, wurden bei den HeLaWT-, HeLa-Cx43WT- und HeLa-Cx43_(Δ234-243)-Zellen mindestens 20 Injektionen durchgeführt, bei den Cx43_(Δ253-256)-Zellen aufgrund der breiten Streuung der koppelnden Zellen 60 Injektionen. Die Kopplungseigenschaften innerhalb der verschiedenen Zell-Linien, welche die mutierten Formen von Cx43 exprimieren, ist im Vergleich zu Cx43WT-Zellen stark reduziert.

Bei der Cx43_(Δ234-243)-Mutation ist noch eine sehr geringe Kopplung möglich. Das deutet darauf hin, dass doch einige Connexine bis zur Membran transportiert und inseriert werden, und dort einen funktionsfähigen Kanal bilden können. Da mit Hilfe der Immunfluoreszenz-Analysen keine plaqueähnlichen Strukturen nachgewiesen werden, scheint es sich um sehr kleine Plaques oder um Einzelkanäle zu handeln.

Die Kopplung bei Cx43_(Δ253-256)-Kanälen ist bei beiden Farbstoffinjektionen um 80 bis 90 % geringer als bei Cx43WT-Kanälen, wobei weniger Cx43-Protein exprimiert wird als in den Cx43WT-HeLa-Zellen. Die reduzierte Kopplung könnte auf die verringerte Menge an exprimiertem CX43-Protein zurückzuführen sein, auf die höhere Menge an zytoplasmatisch lokalisiertem Cx43, als auch auf das ablatierte Serin 255 (siehe Abschnitt 1.2.3) zurückzuführen sein. Letzteres kann im WT von Kinasen phosphoryliert werden, welche einen negativen Einfluss auf die Kommunikation haben (Pahujaa et al., 2007). Wird der kleinere Farbstoff Neurobiotin injiziert, koppeln mehr Zellen als bei der Injektion mit dem größeren Lucifer Yellow. Da die Verhältnisse der Anzahl koppelnder Zellen bei beiden Farbstoffen ähnlich sind, ist die Größendifferenz der Farbstoffmoleküle und nicht die Ladungsdifferenz als Ursache wahrscheinlich.

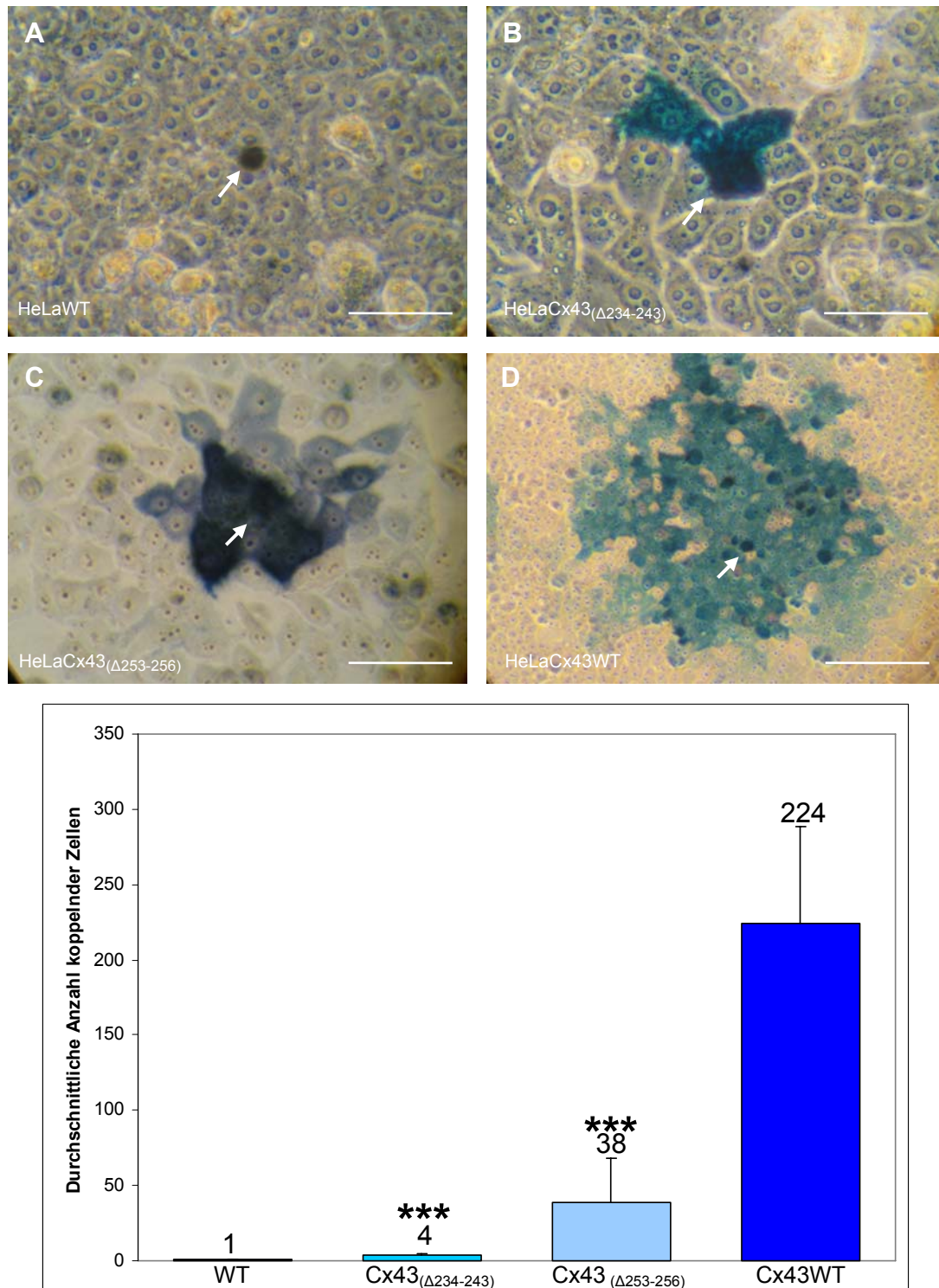


Abb. 4.11: Mikroinjektion verschiedener HeLa-Zell-Linien mit Neurobiotin. Die jeweils injizierte Zelle ist mit einem Pfeil markiert. A: HeLaWT-Zellen B: HeLa-Cx43($\Delta 234-243$)-Zellen C: HeLa-Cx43($\Delta 253-256$)-Zellen D: Cx43WT-Zellen (Größenstandard A – C = 20 μm , D = 50 μm). Bei beiden Mutationen Cx43($\Delta 234-243$) und Cx43($\Delta 253-256$) ist die Kopplung im Vergleich zu Cx43-Kanälen stark reduziert (hoch signifikant), der Mittelwert der koppelnden Zellen ist über dem jeweiligen Fehlerbalken angegeben (in Kooperation mit Jiong Zhang). Zu beachten ist die geringere Menge an exprimiertem Cx43-Protein der HeLa-Cx43($\Delta 234-243$)- und HeLa-Cx43($\Delta 253-256$)-Zellen im Vergleich zu HeLaCx43WT-Zellen.

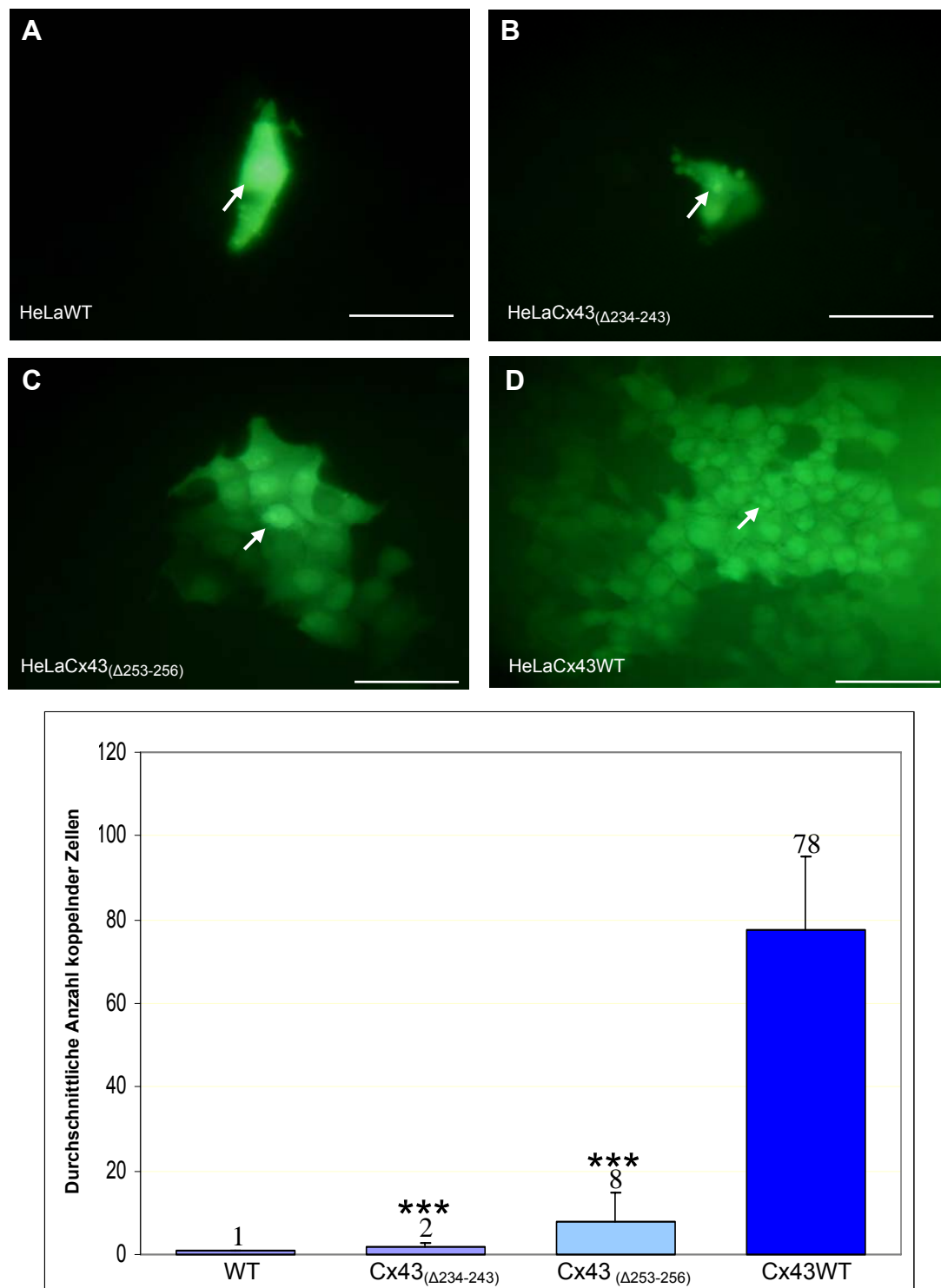


Abb. 4.12: Mikroinjektion verschiedener HeLa-Zell-Linien mit Lucifer Yellow. Die jeweils injizierte Zelle ist mit einem Pfeil markiert. A: HeLaWT-Zellen B: HeLa-Cx43_(Δ234-243)-Zellen C: HeLa-Cx43_(Δ253-256)-Zellen D: Cx43WT-Zellen (Größenstandard A = 10 μm, B – D = 20 μm). Bei beiden Mutationen Cx43_(Δ234-243) und Cx43_(Δ253-256) ist die Kopplung im Vergleich zu Cx43-Kanälen stark reduziert (hoch signifikant), der Mittelwert der koppelnden Zellen ist über dem jeweiligen Fehlerbalken angegeben (in Kooperation mit Jiong Zhang). Zu beachten ist die geringere Menge an exprimiertem Cx43-Protein der HeLa-Cx43_(Δ234-243)- und HeLa-Cx43_(Δ253-256)-Zellen im Vergleich zu HeLaCx43WT-Zellen.

4.3 Erzeugung und Charakterisierung Cx43D378stop exprimierender ES-Zellen der Maus

Im Folgenden galt es zu klären, welche Prozesse im Einzelnen von einer Protein-Interaktion zwischen ZO-1 und Cx43 betroffen sind. Da in der bereits existierenden Cx43K258stop-Maus durch die Ablation von 125 AS viele Protein-Interaktionsdomänen und Phosphorylierungsstellen nicht mehr vorhanden sind, ist eine Zuordnung des starken Phänotyps zu einer oder mehreren Interaktionen nicht möglich. Um die Funktion einer einzelnen Interaktion zu klären, wurde daher die Ablation der ZO-1-Interaktionsdomäne ausgewählt, da sie im Herzen und in der Haut eine wichtige Rolle spielt. Da Cx43KO-Mäuse postnatal letal sind, wurde für die Ablation der ZO-1-Interaktionsdomäne ein konditionelles Modell gewählt. Mit dem nun realisierbaren gewebespezifischen Ausschalten des Cx43WT-Proteins eröffnete sich die Möglichkeit, die Funktion der Cx43- und ZO-1-Interaktion in verschiedenen Geweben zu untersuchen.

4.3.1 Klonierung des KI-Vektors

Es sollte ein KI-Vektor erzeugt werden, der eine von loxP-Stellen flankierte *Gja1*WT-Sequenz und eine von zwei frt-Stellen eingerahmte Neomycin-Resistenzkassette beinhaltet. Danach sollte die verkürzte *Gja1*-Sequenz für das Cx43D378stop-Protein liegen, gefolgt von einer IRES-Kassette und dem eGFP-Reportergen. Um eine homologe Rekombination zu ermöglichen, besitzt der Vektor jeweils am 3'- und 5'-Ende homologe *Gja1*WT-Sequenzen. Die 5'-Homologieregion ist etwa 4,9 kb, die 3'-Homologieregion etwa 1,2 kb groß. Da sich die WT-Sequenz von der mutierten Sequenz nur in 15 Basen unterscheidet, kommen zwei fast identische Sequenzen im KI-Vektor vor (siehe Abb. 4.15). Dadurch wurde eine hohe Rate von homologen Rekombinationen in den Maus-ES-Zellen erwartet, die die komplette Sequenz des KI-Vektors nicht vollständig gegen die WT-Sequenzen austauschen.

Zur Klonierung des KI-Endvektors konnte der TeasydZO-1-Vektor verwendet werden (siehe Abb. 4.3). Insgesamt bestand die Klonierung aus fünf Schritten (siehe Abb.4.14), die sich in zwei Klonierungswege gliedern lassen. Beim ersten Klonierungsweg wurden alle wichtigen Sequenzen zwischen die loxP Stellen kloniert, beim zweiten erfolgte die Fertigstellung des KI-Vektors.

Schritt 1: Die mutierte *Gja1*-Sequenz (*Cla*I, *Eco*RI, blunt) wurde aus dem TeasydZO-1-Vektor (1) ausgeschnitten und in den pBSKd*Cla*Cx43WT-Vektor (2) (*Cla*I, *Xba*I) einkloniert.

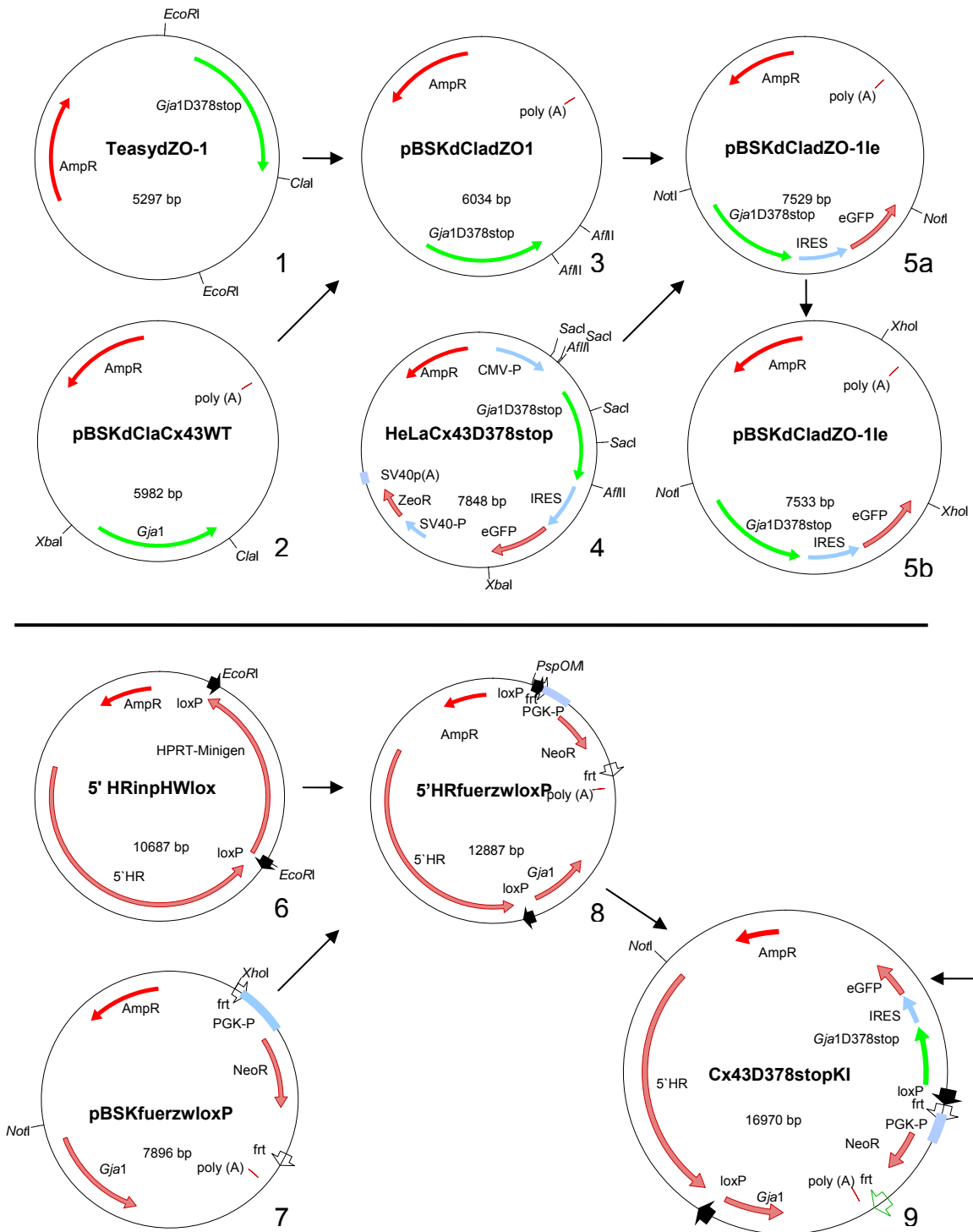


Abb. 4.13: Klonierungsschema zur Erzeugung des KI-Vektors (9). Dieser wurde durch die zwei getrennten Klonierungswege erzeugt und besteht aus der Gja1WT-Sequenz, der geflochten Neo-Resistenzkassette, dem Gja1D378stop-Gen, der IRES und dem eGFP-Gen.

Schritt 2: Der daraus resultierende pBSKdCladZO-1-Vektor (3) wurde partial verdaut (*AflII*) und die IRES-eGFP-Sequenz aus dem HeLaCx43D378stop-Vektor (4) (*AflII*, *SacI*, *XbaI*, siehe 4.2.1.1) einkloniert. Die Verwendung des Restriktionsenzym *SacI* war notwendig,

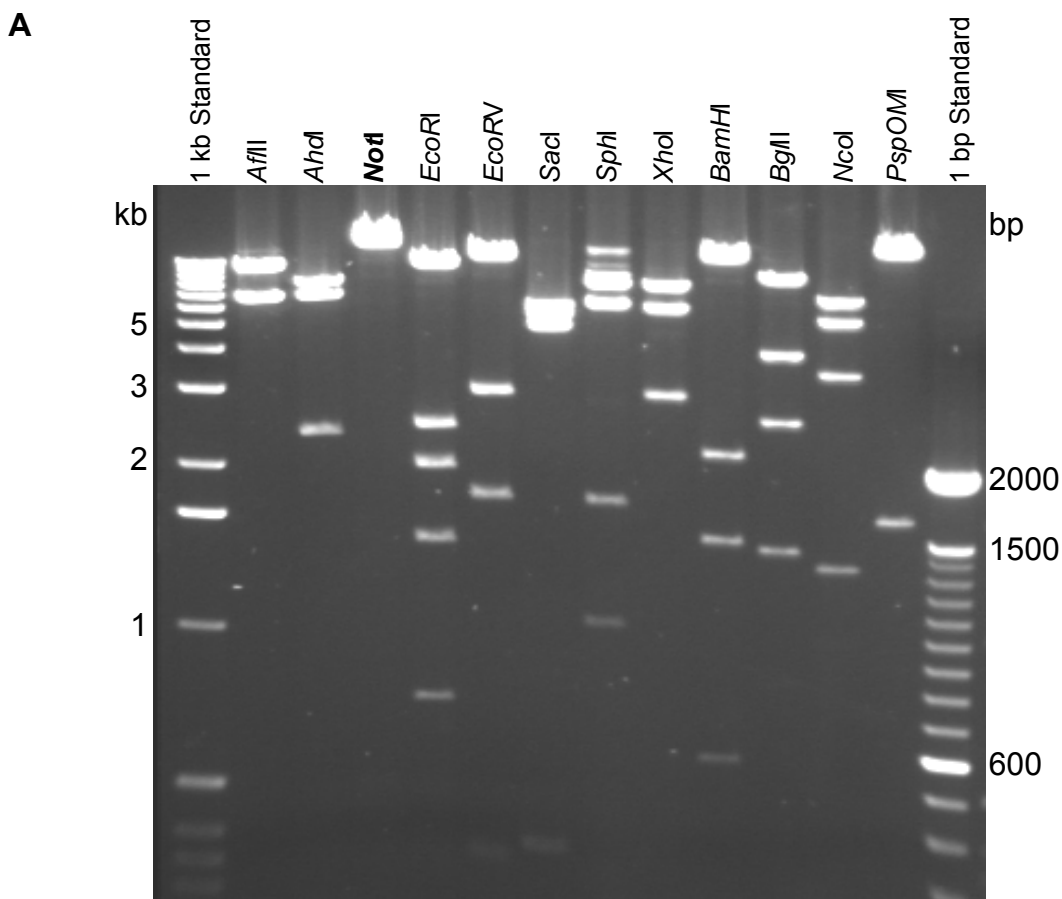
damit nach der Restriktionsspaltung nicht zusätzliche Fragmente mit einer ähnlichen Länge wie das erwünschte IRES-eGFP entstehen.

Schritt 3: Aus dem entstandenen pBSKdCladZO-1le-Vektor (**5a**) wurde die *NotI*-Schnittstelle hinter der eGFP-Sequenz entfernt (*NotI* Partialverdau) (**5b**).

Schritt 4: In den Vektor 5'HRinPHWlox (**6**) (*EcoRI*) wurde die *Gja1*WT-Sequenz mit der von *frt*-Stellen flankierten Neomycin-Resistenzkassette aus dem Vektor pBSKfuerzwloxP (**7**) (*XhoI*, *NotI*) eingebracht.

Schritt 5: In den daraus entstandenen 5'HRfuerzwloxP-Vektor (**8**) (*PspOMI*) wurde die *Gja1*D378stop-IRES-eGFP-Sequenz aus dem pBSKdCladZO-1le-Vektor (**5b**) (*ScaI*, *XbaI*) stromabwärts der zweiten loxP-Stelle inkliniert. Durch diesen letzten Klonierungsschritt entstand der fertige KI-Vektor Cx43D378stop (**9**), der mit *NotI* linearisiert werden kann.

Der dadurch gewonnene Cx43D378stopKI-Vektor war vor seiner Verwendung weiter zu charakterisieren. Zu diesem Zweck wurden Restriktionsanalysen durchgeführt, in denen zuvor schon in der Klonierung verwendete Restriktionsenzyme und das Linearisierungs-enzym *NotI* benutzt wurden (siehe Abb. 4.14).



B

Cx43D378stop	
Enzym	erwartete Fragmente (bp)
<i>Afl</i> III	6677, 10293
<i>Ahd</i> I	2314, 6677, 7979
<i>Not</i>I	16970 (linearisiert)
<i>Eco</i> RI	76 (2x), 719, 1418, 2081, 2383, 10217
<i>Eco</i> RV	318, 1713, 2887, 12052
<i>Sac</i> I	345 (2x), 4845, 5425, 6010
<i>Sph</i> I	1016, 1695, 6127, 8132
<i>Xho</i> I	2887, 6068, 8015
<i>Bam</i> HI	569, 1458, 2136, 12807
<i>Bgl</i> II	8, 1417, 2560, 3952, 9033
<i>Nco</i> I	123, 1324, 3388, 5271, 6864
<i>Psp</i> OMI	1596, 15374

Abb. 4.14: Restriktionsverdauanalyse des Cx43D378stopKI-Vektors. (A) Der Cx43D378stopKI-Vektor wurde mit in der Klonierung verwendeten Restriktionsenzymen gespalten. Die erwarteten Fragmente sind in (B) wiedergegeben. Die Fragmente nach der Spaltung entsprachen den Erwartungen.

Die Restriktionsanalyse lieferte die erwarteten Fragmente. Die Vollständigkeit und die mutationsfreie Sequenz des Cx43D378stop-Vektors wurden anschließend durch Sequenzierung bestätigt.

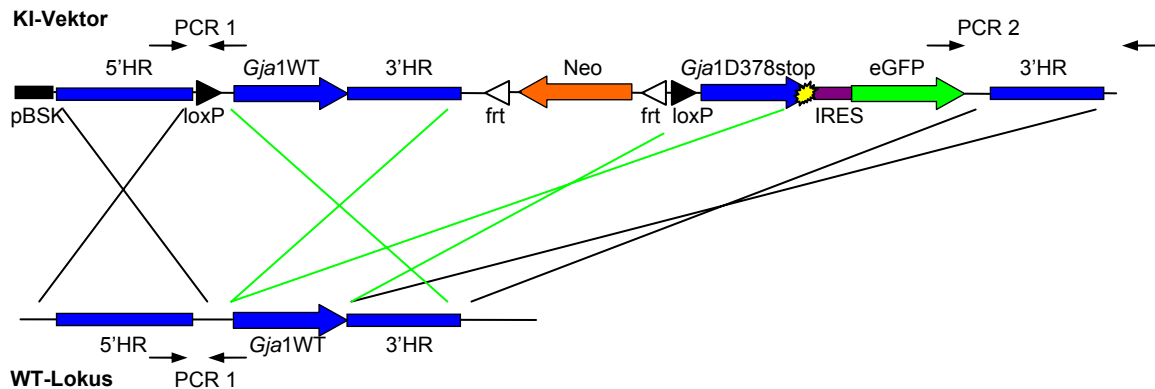


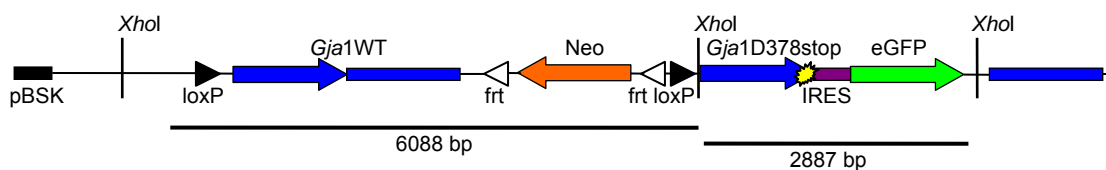
Abb. 4.15: Schematische Darstellung der homologen Rekombination der KI-Konstrukts (oben) mit dem WT-Lokus in ES-Zellen (unten). Die Rekombinationsmöglichkeiten für die 5'HR (rechts) und die 3'HR (links) sind in schwarz eingezeichnet. Die beiden zusätzlichen Möglichkeiten für eine interne Rekombination sind grün eingezeichnet. Zur Überprüfung der Rekombination sind zwei PCRs aufgeführt. Mit der PCR 1 wird das Vorhandensein der 5'-loxP-Stelle überprüft, mit der PCR 2 wird die homologe Rekombination auf der 3'-Seite getestet.

4.3.2 Funktionsanalyse der loxP- und frt-Stellen des Cx43D378stopKI-Vektors

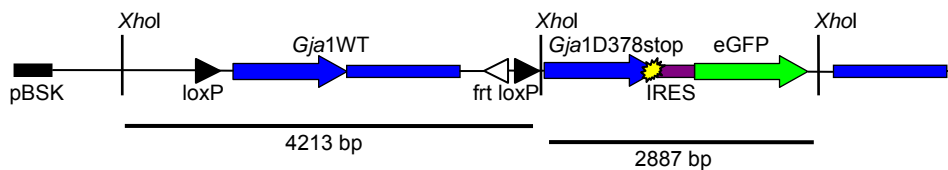
Zur vollständigen Analyse des Cx43D378stopKI-Vektors gehörte eine Funktionsanalyse der eingebrachten loxP- und frt-Stellen.

Dazu wurde der KI-Vektor in Cre- bzw. Flp-Rekombinase exprimierende *E.coli*-Bakterien transformiert (Buchholz et al., 1998). Die entsprechende Rekombinase schneidet in der Plasmid-DNS die zwischen den entsprechenden Stellen liegende Sequenz aus, da die Rekombinase-Erkennungsstellen in der gleichen Orientierung vorliegen. Anschließend wurde die DNS aus den Bakterien gewonnen, mit dem Restriktionsenzym *Xho*I gespalten und analysiert (siehe Abb. 4.16).

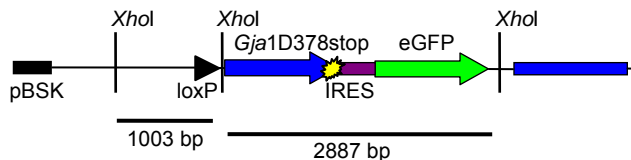
KI-Vektor in XL 1-blue *E.coli*:



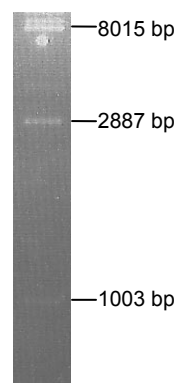
KI-Vektor in Flp-*E.coli*:



KI-Vektor in Cre-*E.coli*:



Restriktionsspaltung mit *Xho*I. Flp-*E.coli*:



Cre-*E.coli*:

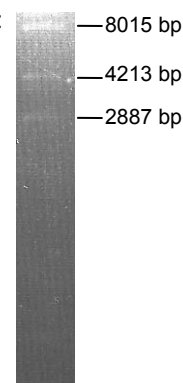


Abb. 4.16: Funktionsanalyse der loxP- und frt-Stellen des Cx43D378stopKI-Vektors. Unter den Schemadarstellungen des KI-Vektors in Cre- bzw. Flp-*E.coli* sind die Ergebnisse der dazugehörigen *Xho*I-Restriktionsspaltung dargestellt. In den Schemata sind alle *Xho*I-Schnittstellen dargestellt und die zu erwarteten Fragmente eingezeichnet. Das Fragment mit einer Größe von 8015 bp ist das Vektorrückgrat und in den Schemata nicht eingezeichnet.

Die erwarteten Fragmente wurden nach der Restriktionsspaltung nachgewiesen. Dadurch wurde gezeigt, dass die loxP- und frt-Stellen funktionell sind.

Hiermit war die Analyse des fertigen KI-Vektors abgeschlossen. Der Cx43D378stopKI-Vektor wurde für die ES-Zellkultur verwendet. Zuvor war es aber notwendig, PCRs zu etablieren, mit deren Hilfe eine erfolgreiche Rekombination in ES-Zellen nachgewiesen werden kann.

4.3.3 Etablierung von PCRs zum Test auf homologe Rekombination in ES-Zellen

Um zu untersuchen, ob der Cx43D378stopKI-Vektor homolog ins Genom der ES-Zellen rekombinierte, wurden zwei PCRs etabliert, die dies nachweisen sollten (beide PCRs sind in Abb. 4.15 eingezeichnet). Als Matrize für die PCR2 diente der Vektor pBSKdCladZO-1le (**5a**) (siehe Abb. 4.13). Diese PCR ergibt nur dann ein Amplikon (1,2 kb), wenn die eGFP-Sequenz nach erfolgreicher homologer Rekombination im Genom vorhanden ist (denn in der eGFP Sequenz bindet das zweite Startermolekül). Mit ihrer Hilfe kann das Vorhandensein einer loxP-Stelle am 5'-Ende ermittelt werden (277 bp im WT, 324 bp beim Vorhandensein einer loxP-Stelle). Die genauen PCR-Protokolle sind unter 3.2.3 zu finden.

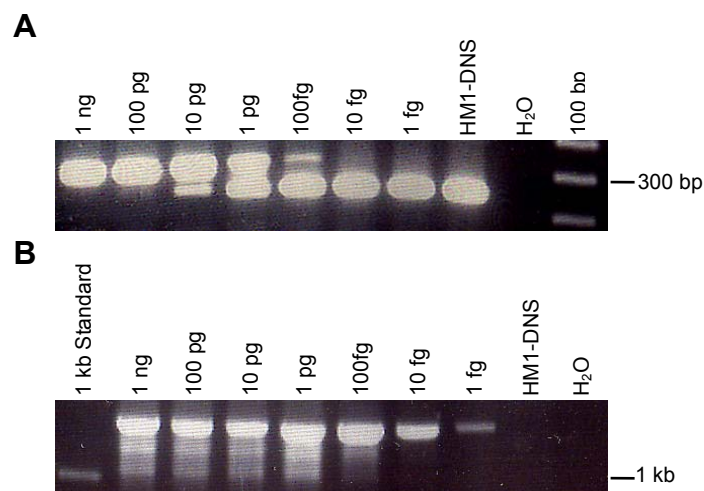


Abb. 4.17: Untersuchungen zur Sensitivität der PCRs, die zur Charakterisierung der ES-Zellklone verwendet wurden. A: loxP-PCR: zu den verschiedenen Konzentrationen des PCR-Testvektors wurde immer auch HM1-DNS hinzugegeben, um den Unterschied zwischen WT- und loxP-Bande (277 bp und 324 bp) aufzuzeigen. B: 3'HR-PCR mit einem Amplikon von 1,2 kb, wenn das eGFP Reportergen vorhanden ist. Wird HM1-DNS als Matrize eingesetzt, ergibt sich kein Amplikon.

4.3.4 ES-Zellkultur

Nach der Elektroporation waren die Zellen 10 bis 16 Tage in Kultur auf Selektionsmedium, bevor die Klone vereinzelt und expandiert wurden. Von den einzelnen Klonen wurde die DNS präpariert und zuerst mit der 3'HR-PCR (PCR 2, siehe Abb. 4.15) analysiert. Positiv getestete Klone wurden anschließend mit der loxP-PCR (PCR 1, siehe Abb. 4.15) analysiert.

	Klonanzahl	3'HR positiv (PCR 2)	loxP positiv (PCR 1)	in beiden PCRs positiv
E1	423	80	75	17,75 %
E2	144	10	8	5,55 %
E1 + E2	567	90	83	14,63 %

Tab. 4.2: Anzahl analysierter Klone und die Anzahl der PCR positiv getesteten ES-Zellklone (E = Elektroporation).

Diese 83 PCR-positiven Klone wurden mit Hilfe einer Southernblot-Analyse analysiert. Wegen der erwarteten hohen Rate nicht vollständig homolog rekombinierter Klone wurden alle PCR positiven Klone analysiert (siehe Abb. 4.15).

4.3.5 Southernblot-Analyse der ES-Zellklone

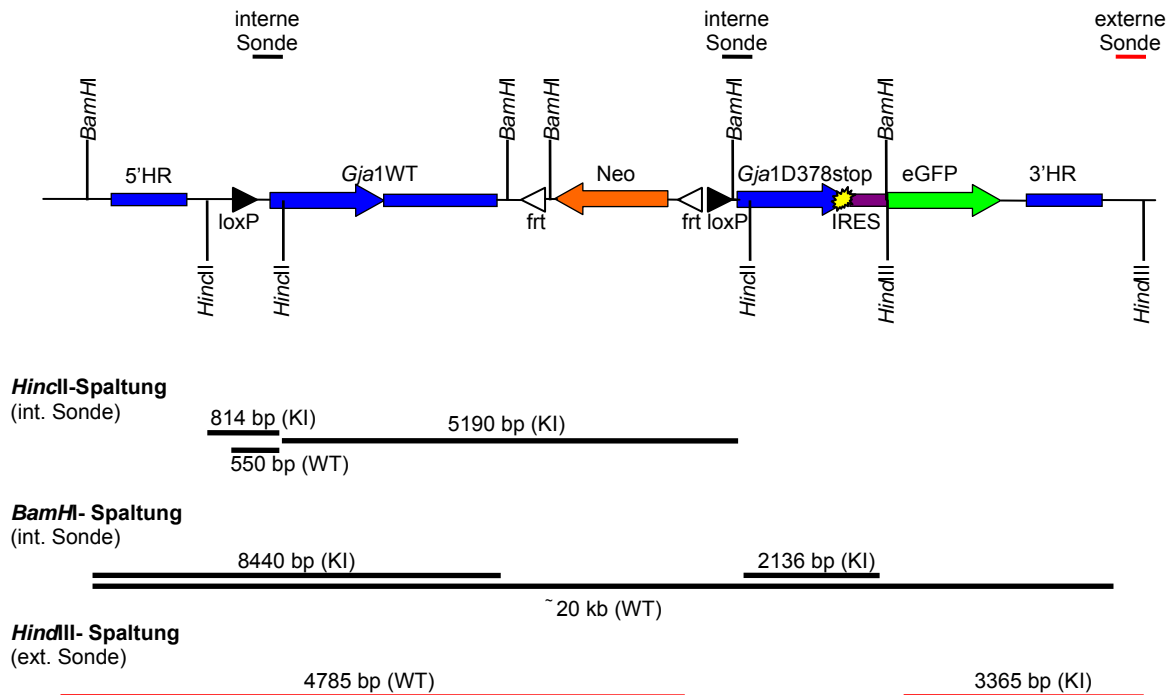
Um eine endgültige Aussage treffen zu können, ob die homologe Rekombination erfolgreich war, wurde eine Southernblot-Analyse durchgeführt. Mit ihr lässt sich erkennen, ob das KI-Konstrukt an die richtige Stelle des Genoms inserierte, wie oft und ob es vollständig inserierte. Um die Insertion des Cx43D378stopKI-Vektors zu überprüfen, wurden drei verschiedene Restriktionen der DNS vorgenommen und zwei verschiedene Sonden benutzt (siehe Abb. 4.18).

Durch einen Verdau der DNS mit *HincII* und einer anschließenden Verwendung der internen Sonde, welche an den 5'-Bereich kurz vor und in der Cx43 kodierenden Region bindet, sollte nochmals das Vorhandensein der 5'loxP-Stelle überprüft werden. Der Unterschied zwischen WT und homolog rekombiniertem Zustand entsteht dadurch, dass durch das Einfügen der loxP-Stelle eine *HincII*-Schnittstelle deletiert wurde, die im WT-Lokus vorhanden ist. Im WT ist dadurch nur ein 550 bp Fragment zu erkennen, im rekombinierten Zustand sowohl ein 814 bp als auch ein 5190 bp Fragment, da die interne Sonde auch an den 5'-Bereich vor dem *Gja1D378stop*-Gen bindet.

Bei dem durchgeführten *BamHI*-Verdau der DNS und der Verwendung der internen Sonde sollte überprüft werden, wie oft und wo der Vektor inserierte. Im rekombinierten Zustand sollten zwei Fragmente mit den Größen 8440 bp und 2136 bp detektiert werden, da im homolog rekombinierten Bereich zwei im 5'-Bereich identische *Gja1*-Gene im Genom zu finden sind. Im WT-Lokus dagegen wurde nur ein Fragment von einer Größe von 20 kb erwartet.

Um eine Aussage über den richtigen Insertionsort treffen zu können, wurde die DNS mit *Hind*III verdaut und eine externe Sonde verwendet, die im nicht translatierten 3'-Bereich hinter dem *Gja1* kodierenden Bereich bindet. Im rekombinierten Zustand sollte ein 3365 bp Fragment, im WT ein 4785 bp Fragment nachweisbar sein.

rekombinierter Zustand:



WT-Zustand:

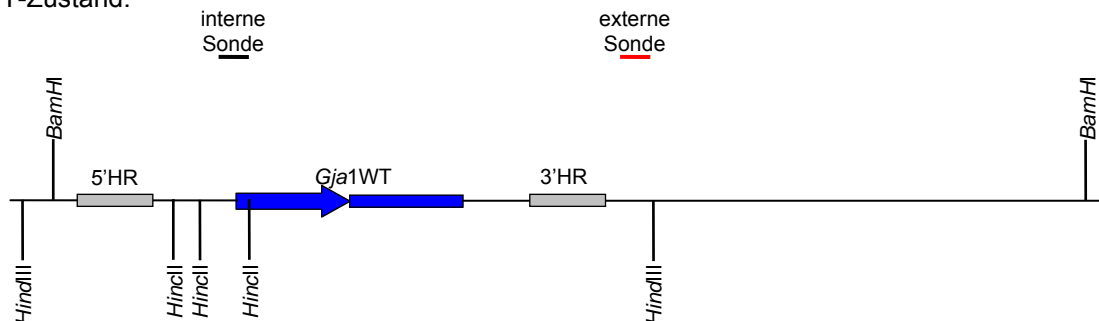


Abb. 4.18: Strategie der Southernblot-Analyse zur Kontrolle der homologen Rekombination in ES-Zellen. Dargestellt sind die benutzten Restriktionsenzyme und die dazugehörigen DNS-Fragmente, wie sie im rekombinierten- und im WT-Zustand zu finden sind. Ebenso sind die Bindungsbereiche der internen und externen Sonde (jeweils 550 bp lang) eingezeichnet.

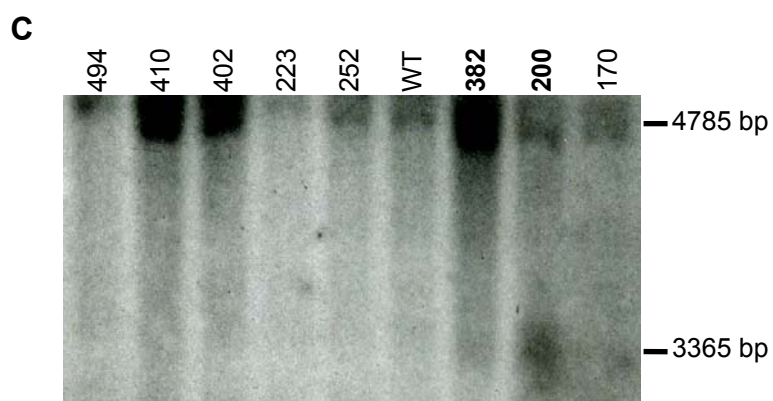
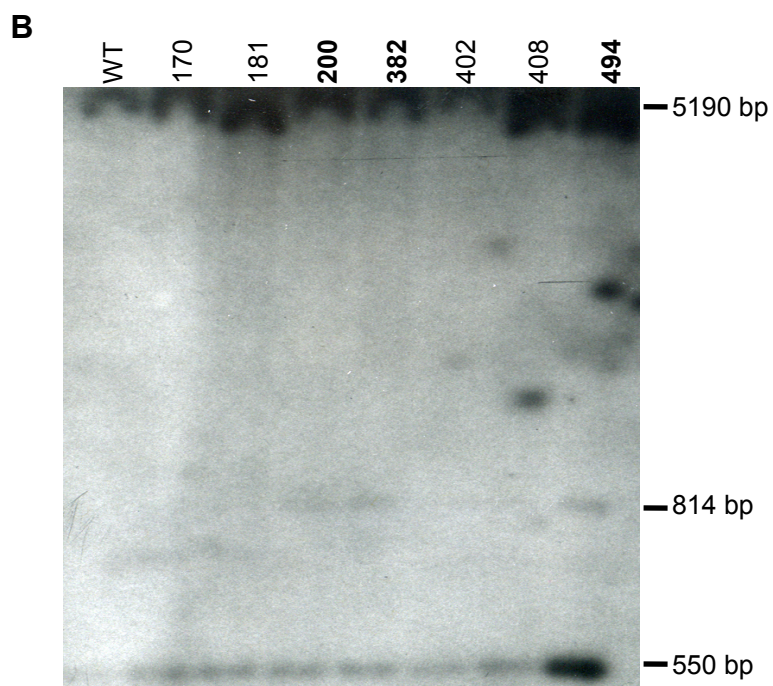
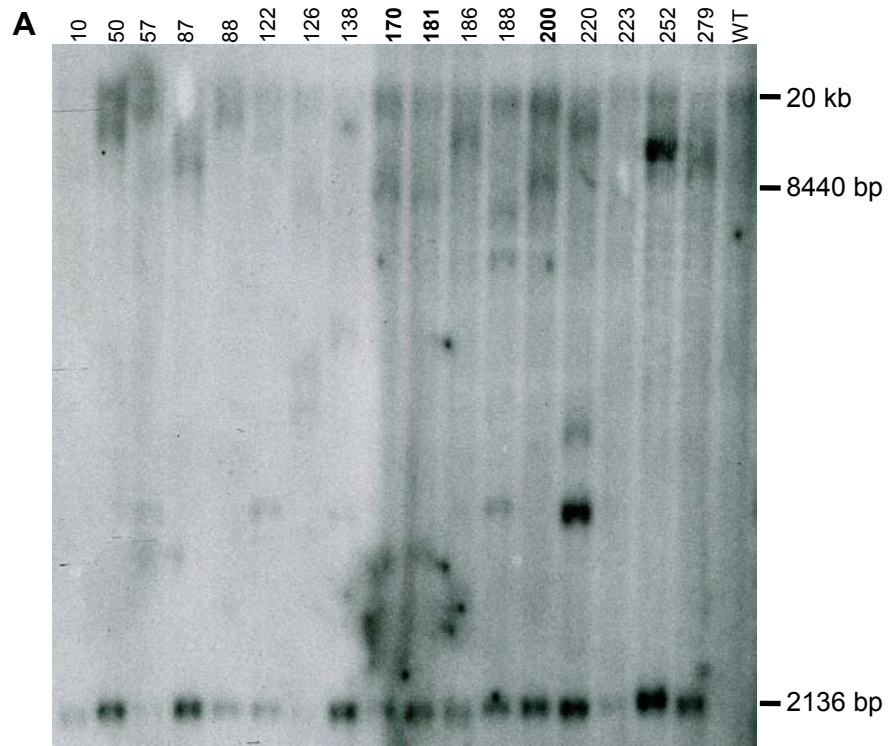


Abb. 4.19: Southernblot-Analyse der ES-Zellklone. Die erwarteten Fragmente (siehe Abb. 4.18) sind rechts neben den Blots angegeben, positive ES-Klone sind fettgedruckt. A: *Bam*HI-Verdau und Hybridisierung mit der internen Sonde. B: *Hinc*II-Verdau und Hybridisierung mit der internen Sonde. C: *Hind*III-Verdau und Hybridisierung mit der externen Sonde. Nach der Analyse aller 83 getesteten Klone wurden die Klone 200 und 382 weiterverwendet.

Durch die Southernblot-Analyse wurden 2 Klone charakterisiert, die für alle Analysen positive Ergebnisse lieferten (Klon 200 und 382). Es waren am Ende nur 2 Klone von insgesamt 567 analysierten Klonen positiv, das entspricht einer homologen Rekombinationsrate von 0,35 %. Die beiden positiven Klone wurden vor einer möglichen Verwendung für die Blastozysteninjektion weiter charakterisiert, indem der Karyotyp der ES-Zellen ermittelt wurde. Dadurch sollte überprüft werden, ob es zu größeren Chromosomenschäden, z.B. Aneuploidien, gekommen war und die Anzahl der Chromosomen von 40 im Mausgenom vorkommenden abweicht.

4.3.6 Karyotyp-Analyse

Um den Euploidiegrad zu ermitteln, wurden von jedem Klon 15 Metaphasenzellen ausgezählt. Da beide untersuchten Klone einen Euploidiegrad von 90 bzw 93 % aufwiesen, wurden sie anschließend für die Blastozysteninjektion benutzt. Der Klon 200 wurde sechsmal, der Klon 382 dreimal für die Injektionen verwendet.

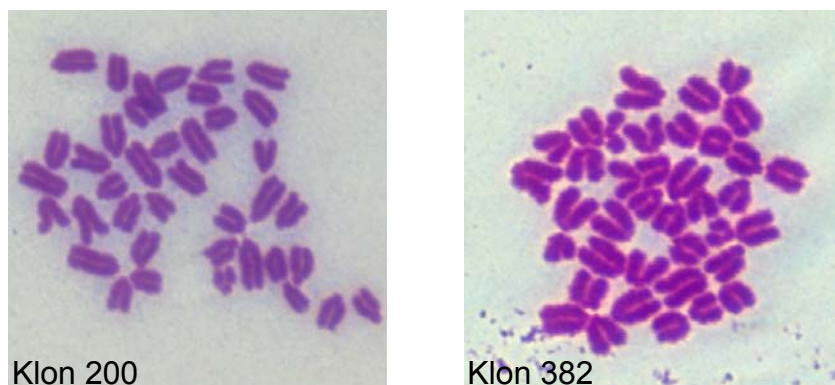


Abb. 4.20: Karyotyp-Analyse. Giemsafärbung der Chromosomen aus zum Platzen gebrachten Metaphasezellen.

ES-Zellklon	ausgezählte Metaphasenzellen	Prozentsatz euploider Metaphasenzellen (40 Chromosomen)
200	15	93 %
382	15	90 %

Tab. 4.3: Auswertung der Karyotyp-Analyse der homolog rekombinierten ES-Zellklone 200 und 382.

4.4 Erzeugung und Zucht transgener Mäuse mit ablatierter ZO-1-Bindedomäne

Mit den beiden ES-Zellklonen 200 und 382 wurde nach deren Charakterisierung (unter Abschnitt 4.3 beschrieben) eine chimäre Maus erzeugt, die zur Zucht der Cx43D378stop-Maus diente. Um die Bedeutung der Interaktion von Cx43 und ZO-1 genauer analysieren zu können, sollten an diesen Tieren verschiedene Experimente durchgeführt werden.

4.4.1 Erzeugung chimärer Mäuse durch Blastozysteninjektion homolog rekombinierter ES-Zellen

Über einen Zeitraum von drei Wochen wurden Injektionen der homolog rekombinierten ES-Klone 200 und 382 in Blastozysten durchgeführt. Klon 200 wurde zwei Wochen lang, Klon 382 eine Woche lang injiziert. Die Injektionen erfolgten jeweils montags bis mittwochs. Aus der ersten Reihe (Klon 200) (29.5.07 bis 31.5.07) ergab sich keine, aus der zweiten Reihe (Klon 382) (4.6.07 bis 6.6.07) zwei (1 x 2 und 1 x 5 Junge) und aus der dritten Reihe (Klon 200) (11.06.07 bis 13.06.07) ebenfalls zwei Geburten (1 x 4 und 1 x 9 Junge) (siehe Tab. 4.4). Von den insgesamt 20 lebenden Nachkommen (13 von Klon 200, 7 von Klon 382) waren 7 chimär (4 von Klon 200, 3 von Klon 382) – 5 Männchen (2 von Klon 200, 3 von Klon 382) und 2 Weibchen (Klon 200). Die Tiere zeigten einen Fellfarben-Chimärismus von 60 bis 100 % (siehe Tab. 4.5). Die chimären Nachkommen wurden mit C57BL/6 Tieren verpaart, wobei sich zeigte, dass alle Tiere fertil waren. 4 Männchen (1 von Klon 200, 3 von Klon 382) zeigten eine Keimbahntransmission des Cx43D378stop-Allels. Der prozentuale Anteil des Nachwuchses mit einem transgenen Allel variierte bei allen 4 Chimären (siehe Tab. 4.6).



Abb. 4.21: Cx43D378stop-Chimäre. Chimäre 1 zeigte einen 100 prozentigen Fellfarben-Chimärismus und war Überträger der Cx43D378stop-Mutation. Durch den gemischten genomischen Hintergrund der verwendeten HM-1 ES-Zellen manifestiert sich eine diphänotypische Ausprägung des Fells (Jackson, 1997; Duhl et al. 1994; Wilkie et al. 2002).

Klon	injizierte Blastozysten	implantierte Muttertiere	davon schwanger	Chimären
200	259	14	2	4 (1 – 4)
382	123	8	2	3 (5 – 7)

Tab. 4.4: Übersicht injizierter Blastozysten, der daraus hervorgegangenen Schwangerschaften und des chimären Nachwuchses.

Chimäre	Geschlecht	Fellfarben-Chimärismus	Fertilität	Keimbahntransmission
1	männlich	100 %	ja	ja
2	männlich	80 %	ja	nein
3	weiblich	60 %	ja	nein
4	weiblich	70 %	ja	nein
5	männlich	90 %	ja	ja
6	männlich	100 %	ja	ja
7	männlich	100 %	ja	ja

Tab. 4.5: Beschreibung der erhaltenen Chimären unter Angabe des prozentualen Anteils am Fellfarben-Chimärismus, der Fertilität und der Weitervererbung des *Gja1D378stop*-Allels.

Chimäre	Nachwuchs	davon transgen	Anteil in %
1	25	10	40
2	18	----	----
3	3	----	----
4	11	----	----
5	25	6	24
6	7	2	28,5
7	26	6	23
insgesamt	115	24	----

Tab. 4.6: Übersicht über die Keimbahntransmission der erhaltenen Chimären. Dazu die Übersicht über den aus den Verpaarungen erhaltenen Nachwuchs und den Anteil transgener Nachkommen.

4.4.2 Überprüfung transgener Mäuse mit Hilfe der PCR-Analytik

Die heterozygoten Cx43D378stop-Tiere wurden mit C57BL/6-Tieren verpaart, damit ein genomischer C57BL/6-Hintergrund von mindestens 87,5 % vorhanden ist. Deren heterozygote Nachkommen wurden miteinander verpaart, um für spätere Analysen homozygote Tiere zu erhalten. Weitere heterozygote Tiere wurden mit Cx43^{+/del}-Mäusen verpaart, da K. Maass zeigen konnte (Maass et al., 2007), dass hemizygoten Tiere mit dem Genotyp Cx43^{del/K258stop} lebensfähig waren. Die Ergebnisse sollten mit Cx43^{del/flD378stop}·αMHC-Cre Tieren verglichen werden. Diese Tiere exprimieren heterozygot durch die generelle Deletion der kodierenden Region von *Gja1* das Reportergen LacZ, welches für die β-

Galactosidase kodiert. Weiterhin tragen sie ein Allel, das für die Cre-Rekombinase kodiert und unter der Kontrolle des α MHC-Promoters steht.

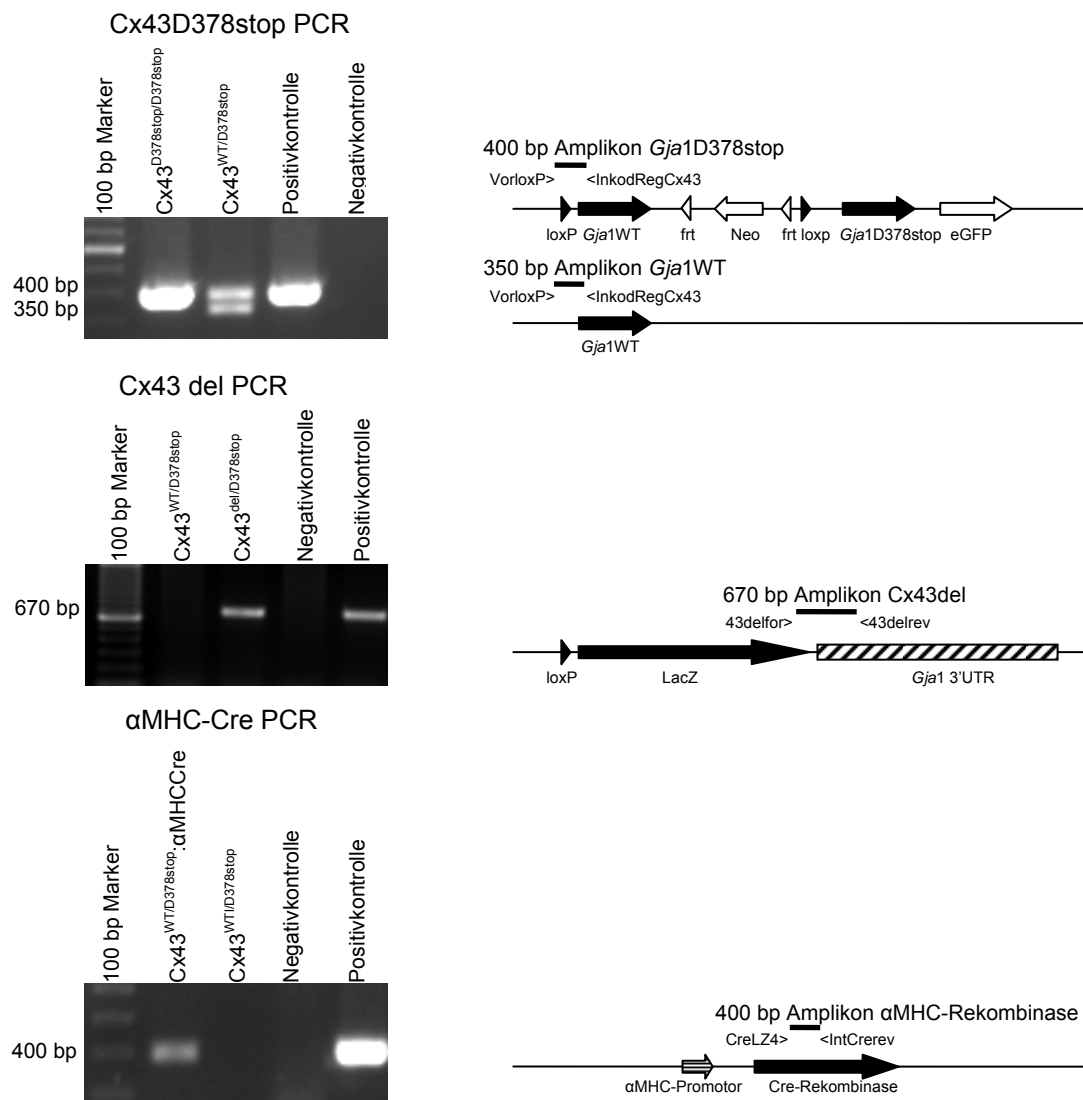


Abb. 4.22: PCR-Analytik transgener Mäuse. Die genomische DNS konnte mit Hilfe verschiedener PCRs auf die verschiedenen Formen des *Gja1*-Allels getestet werden. Durch die Cx43D378stop-PCR wurde mit Hilfe der VorloxP- und InkodReg43-Startermoleküle ein 350 bp Fragment für *Gja1*WT und 400 bp für *Gja1*D378stop amplifiziert. Bei der Cx43 del PCR wurde nur bei Anwesenheit eines *LacZ*-Gens im *Gja1*-Lokus eine Amplikon von 670 bp amplifiziert, bei der α MHC-Cre PCR konnte nur bei Anwesenheit des *Cre*-Rekombinase-Gens ein Amplikon von 400 bp erhalten werden.

Die verschiedenen allelen Formen des *Gja1*-Lokus wurden mit Hilfe der PCR-Analytik unterschieden (siehe Abb. 4.22). Als Positivkontrolle diente die genomische DNS eines homozygoten Tieres der jeweiligen Veränderung.

Durch die Cx43D378stop-PCR wurde unter Verwendung der Startermoleküle VorloxP und InkodReg43 ein 350 bp Fragment für *Gja1*WT und 400 bp für *Gja1*D378stop amplifiziert. Bei Anwesenheit eines *LacZ*-Gens im *Gja1*-Lokus wurde bei der Cx43del PCR ein Amplikon von

670 bp amplifiziert. Nur wenn ein *Cre*-Rekombinase-Gen, unter Kontrolle des α MHC-Promotors im Genom vorliegt, wurde mit Hilfe der α MHC-*Cre* PCR ein Amplikon von 400 bp amplifiziert.

4.5 Analyse der transgenen Cx43D378stop Tiere

4.5.1 Überlebenswahrscheinlichkeit der CX43D378stop Tiere

Bei der Verpaarung von Cx43^{+/-del.}: α MHC-*Cre*-Tieren mit Cx43^{flD378stop/flD378stop}-Tieren verstarben die Tiere mit dem Genotyp Cx43^{del/flD378stop}: α MHC-*Cre* innerhalb von 48 Stunden nach der Geburt (Abb. 4.24). So konnten auch nach mehreren Würfen (mit normaler Wurfgröße) keine adulten Tiere mit dem Genotyp Cx43^{del/flD378stop}: α MHC-*Cre* genotypisiert werden. Die anderen erwarteten Genotypen wurden dagegen häufiger gefunden als nach G. Mendel erwartet (siehe Tab. 4.7).

Bisher wurden 45 Nachkommen aus den Cx43^{+/-del.}: α MHC-*Cre*-Tieren X Cx43^{flD378stop/flD378stop}-Verpaarungen geboren. 14 Tiere starben innerhalb der ersten zwei Tage nach der Geburt, 5 davon wurden genotypisiert und teilweise für weitere Experimente verwendet (siehe Diplomarbeit Jiong Zhang, 2008).

Genotyp	erwartete Verteilung (nach G. Mendel) [%]	tatsächliche Verteilung [%]	Anzahl der genotypisierten Tiere
Cx43 ^{+/-flD378stop}	25	29	9
Cx43 ^{del/flD378stop}	25	39	12
Cx43 ^{+/-flD378stop} : α MHC- <i>Cre</i>	25	32	10
Cx43 ^{del/flD378stop} : α MHC- <i>Cre</i>	25	0	0
insgesamt	100	100	31

Tab. 4.9: Anzahl der Nachkommen aus Cx43^{+/-del.}: α MHC-*Cre*-Tieren X Cx43^{flD378stop/flD378stop}-Verpaarungen. Die Tiere wurden im Alter von 4 bis 5 Wochen genotypisiert, adulte Tiere des Genotyps Cx43^{del/flD378stop}: α MHC-*Cre* waren nicht dabei.

Nimmt man die fünf direkt nach der Geburt verstorbenen und genotypisierten Tiere hinzu, ergibt sich folgende Verteilung der Genotypen (siehe Tab. 4.10).

Genotyp	erwartete Verteilung (nach G. Mendel) [%]	tatsächliche Verteilung [%]	Anzahl der genotypisierten Tiere
Cx43 ^{+/-flD378stop}	25	25	9
Cx43 ^{del/flD378stop}	25	33	12
Cx43 ^{+/-flD378stop} : α MHC- <i>Cre</i>	25	28	10
Cx43 ^{del/flD378stop} : α MHC- <i>Cre</i>	25	14	5
insgesamt	100	100	36

Tab. 4.10: Anzahl der Nachkommen aus Cx43^{+/-del.}: α MHC-*Cre*-Tieren X Cx43^{flD378stop/flD378stop}-Verpaarungen direkt nach der Geburt. Zu diesem Zeitpunkt sind Tiere mit dem Cx43^{del/flD378stop}: α MHC-*Cre* Genotyp zu finden.

Das Ergebnis der Genotypisierungen direkt nach der Geburt entspricht immer noch nicht der erwarteten Verteilung nach Mendel. Wenn die 9 innerhalb der ersten 48 Stunden nach der Geburt gestorbenen und nicht genotypisierten Tiere den Genotyp $Cx43^{\text{del}/\text{flD378stop}}:\alpha\text{MHC-Cre}$ besaßen, wäre die erwartete Mendelsche Verteilung fast erreicht.

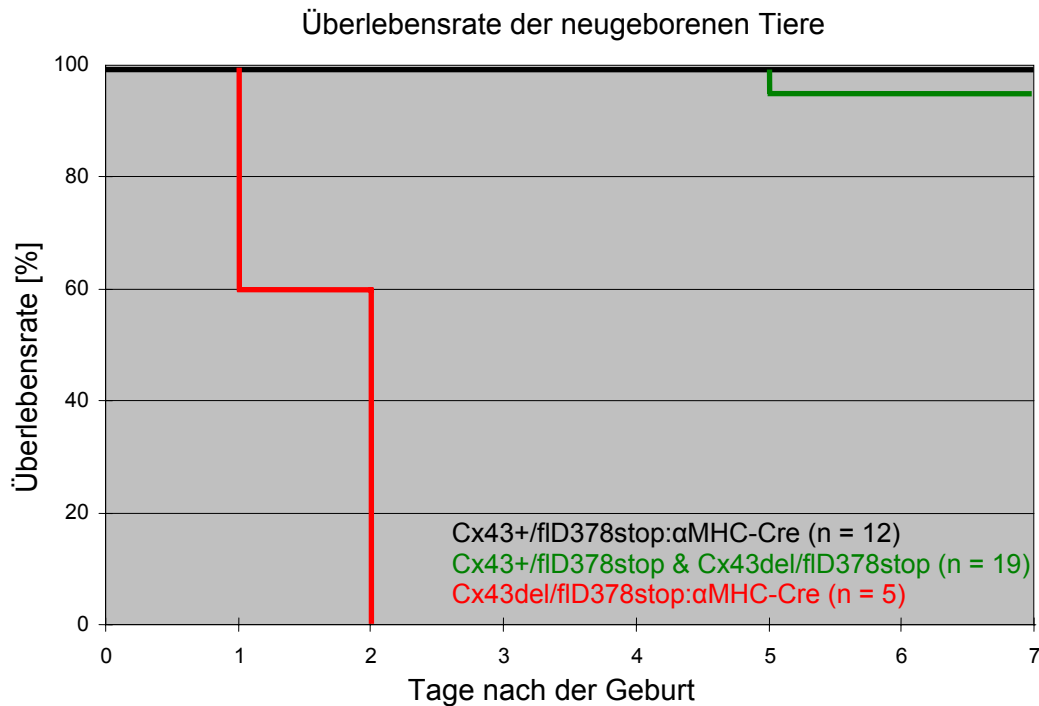


Abb. 4.24: Kaplan-Meier Kurve der Überlebensrate neugeborener Tiere, die aus $Cx43^{+/del}:\alpha\text{MHC-Cre}$ Tieren X $Cx43^{\text{flD378stop}/\text{flD378stop}}$ -Verpaarungen stammen. Deutlich zeichnet sich ab, dass Tiere mit dem $Cx43^{\text{del}/\text{flD378stop}}:\alpha\text{MHC-Cre}$ -Genotyp innerhalb der ersten zwei Tage nach der Geburt sterben.

Der frühe Tod der $Cx43^{\text{del}/\text{flD378stop}}:\alpha\text{MHC-Cre}$ Tiere steht in einem starken Kontrast zu Tieren mit dem Genotyp $Cx43^{\text{del}/\text{K258stop}}$, denn diese zeigen keinerlei auffälligen Phänotyp. Das bedeutet, dass die Ablation der ZO-1-Bindedomäne, die aus nur 5 Aminosäureresten besteht, einen stärkeren Phänotyp ausprägt (d.h. eine frühere Lethalität nach der Geburt) als die Ablation der letzten 125 Aminosäurereste des C-Terminus von Cx43. Die Ursache dafür könnte eine Veränderung der Öffnungszustände der Gap Junction-Kanäle, der Halbwertszeit, der Signalwege oder einer direkten oder indirekten Interaktion sein. Die Ursache für das Sterben der Mäuse muss nun experimentell ermittelt werden. Ein dominanter Effekt der $Cx43^{\text{D378stop}}$ -Isoform kann ausgeschlossen werden, da die heterozygoten $Cx43^{+/flD378stop}:\alpha\text{MHC-Cre}$ -Tiere lebensfähig sind und keinen auffälligen Phänotyp zeigen.

4.6 Funktionsanalyse der Cre-Rekombinase unter der Kontrolle des hGFAP-Promotors in Cx30^{-/-};Cx43^{fl/fl}:hGFAP-Cre-Mäusen

Die Cx30^{-/-};Cx43^{fl/fl}:hGFAP-Cre-Tiere wurden von Dr. M. Theis 2001 durch Kreuzung mehrerer transgener Mauslinien erzeugt. In den dafür verwendeten Cx30^{-/-}-Mäusen wurde das *Gjb6*-Allel (kodiert für das Cx30) durch das Gen der kernlokalisierten β -Galactosidase mittels homologer Rekombination ersetzt. Das *Gja1*-Allel (Cx43) ist von zwei loxP-Stellen umschlossen und wird beim Vorhandensein der Cre-Rekombinase unter der Kontrolle des hGFAP-Cre-Promotors gewebespezifisch deletiert. Anstelle von Cx43 wird das β -Galactosidase-Gen nach erfolgter Rekombination exprimiert. Ziel war es, Tiere zu erhalten, deren Astrozyten keine Connexine mehr exprimieren. Vor allem von A. Wallraff (Institut für zelluläre Neurowissenschaften, Universität Bonn) durchgeführte Versuche zeigten, dass funktionell aktive Cre-Rekombinase zu einem Verlust der astrozytären Kopplung in Cx30^{-/-};Cx43^{fl/fl}:hGFAP-Cre-Tieren führt. Im Rahmen dieser Arbeit – und von A. Wallraff zu einem späteren Zeitpunkt ebenfalls – wurde festgestellt, dass die Astrozyten weiterhin Cx43 exprimierten und somit auch weiterhin zur Kopplung befähigt waren.

4.6.1 Funktionsüberprüfung der hGFAP-Cre-Rekombinase mit Hilfe der Westernblot-Analyse

Um die Funktionalität der hGFAP-Cre-Rekombinase zu untersuchen, wurden aus den Hippocampi von Tieren unterschiedlichen Genotyps Proteinlysate hergestellt. Dabei zeigte sich, dass Cx43 trotz des Vorhandenseins von Cre-Rekombinase in den Astrozyten exprimiert wurde. Erneute Kreuzungen mit C57BL/6-Mäusen, die Untersuchung der von Prof. Kettenmann (Institut für zelluläre Neurowissenschaft, Max-Delbrück-Zentrum für Molekulare Medizin, Berlin) erhaltenen Cx30^{-/-};Cx43^{fl/fl}:hGFAP-Cre-Tiere sowie aller vorhandenen Brutpaare ergab nur ein Tier, in dem die Cre-Rekombinase funktionell aktiv war. So wurden schließlich Tiere von Prof. M. Needergard (Division of Glial Disease and Therapeutics, Department of Neurosurgery, University of Rochester) für die Untersuchung der Funktionalität der hGFAP-Cre-Rekombinase verwendet. Von den insgesamt 31 getesteten Hippocampi war nur in einem Tier kein Cx43 nachweisbar (3,2 %). Im Westernblot ist der Unterschied zwischen einer funktionellen und einer funktionslosen hGFAP-Cre-Rekombinase deutlich zu erkennen (siehe Abb. 4.24), denn bei einer aktiven Cre-Rekombinase ist kein bzw. nur noch eine geringe Menge von Cx43 aus Blutgefäßen zu detektieren. Die nicht funktionierenden Cx30^{-/-};Cx43^{fl/fl}:hGFAP-Cre-Tiere werden im folgenden als „Pseudo-Doppel-Knock-Out“ (Pseudo-DKO), die funktionellen Cx30^{-/-};Cx43^{fl/fl}:hGFAP-Cre-Tiere als „Doppel-Knock-Out“ (DKO) bezeichnet.

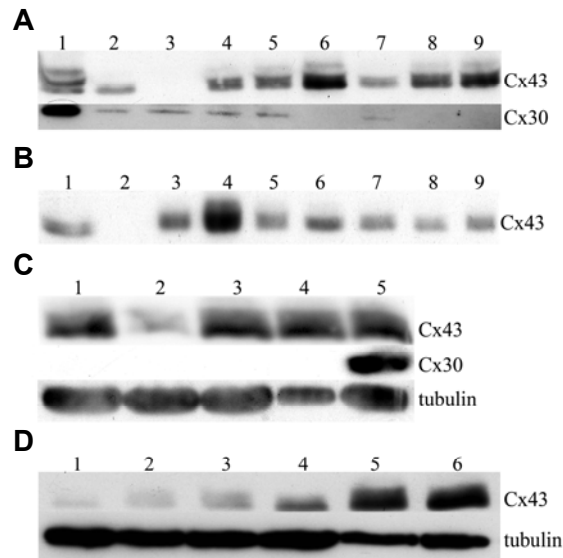


Abb. 4.25: Westernblot-Analyse von Hippocampus-Lysaten von $Cx30^{-/-};Cx43^{fl/fl};hGFAP-Cre$ -Mäusen. **A:** Westernblot-Analyse der zuerst untersuchten Tiere in Bezug auf die Aktivität der Cre-Rekombinase. 1: HeLa-Kontroll-Lysate (Cx43 bzw. Cx30 transfizierte HeLa-Zellen), 2: $Cx30^{+/-};Cx43^{fl/fl}$, 3: $Cx30^{+/-};Cx43^{fl/fl};hGFAP-Cre$ (KO), 4: $Cx30^{-/-};Cx43^{fl/fl}$, 5: $Cx30^{+/-};Cx43^{fl/+}$, 6: $Cx30^{-/-};Cx43^{fl/+}$, 7: $Cx30^{+/-};Cx43^{fl/fl};hGFAP-Cre$ (Pseudo-KO), 8: $Cx30^{-/-};Cx43^{fl/fl};hGFAP-Cre$ (Pseudo-DKO), 9: $Cx30^{-/-};Cx43^{+/+};hGFAP-Cre$. Zu erkennen ist, dass Cre in Tier 3 aktiv und in den Tieren 7 und 8 inaktiv war. **B:** Westernblot-Analyse aller verfügbaren Nachwuchstiere. 1: HeLa-Kontroll-Lysat, 2: $Cx30^{+/-};Cx43^{fl/fl};hGFAP-Cre$, 3: $Cx30^{+/+};Cx43^{fl/fl}$, 4: $Cx30^{-/-};Cx43^{fl/+};hGFAP-Cre$, 5-6: $Cx30^{-/-};Cx43^{fl/fl};hGFAP-Cre$, 7 - 9: $Cx30^{+/-};Cx43^{fl/fl};hGFAP-Cre$. Probe 2 entspricht dem Tier 3 aus A. In den anderen getesteten Tieren war hGFAP-Cre inaktiv. **C:** Vergleich der Cx43-Proteinmenge von Pseudo-DKOs und funktionalen DKOs. 1: $Cx30^{-/-};Cx43^{fl/fl}$, 2: $Cx30^{-/-};Cx43^{fl/fl};hGFAP-Cre$, 3: $Cx30^{-/-};Cx43^{fl/+}$, 4: $Cx30^{-/-};Cx43^{fl/fl};hGFAP-Cre$, 5: $Cx30^{+/+};Cx43^{fl/fl}$. Die Tiere 1 und 2 sind Geschwistertiere der funktionierenden DKOs, die Tiere 3 und 4 sind Geschwistertiere von Pseudo-DKOs. Von Tier 4 wurde auch eine Probe zur Promotor-Methylierung benutzt (siehe Abschnitt 4.6.3). **D:** Die funktionellen DKO-Tiere zeigen den Verlust von Cx43 in verschiedenen Hirnregionen: 1 - 3: Analyse von Hippocampus (1), Cerebellum (2) und Cerebrum (3) eines $Cx30^{-/-};Cx43^{fl/fl};hGFAP-Cre$ -Tieres. 4 - 6: Analyse von Hippocampus (4), Cerebellum (5) und Cerebrum (6) eines $Cx30^{-/-};Cx43^{fl/fl}$ -Tieres. Vom $Cx30^{-/-};Cx43^{fl/fl};hGFAP-Cre$ -Tier wurde eine Probe zur Promotor-Methylierung benutzt.

4.6.2 Funktionsanalyse des hGFAP-Cre Promotors mittels *LacZ*-Färbung

Es wurden *LacZ*-Färbungen an Gehirnschnitten durchgeführt, dabei wurden Gehirne von $Cx30^{-/-}$ und $Cx30^{-/-};Cx43^{fl/fl};hGFAP-Cre$ -Tieren verwendet. Da beide β -Galaktosidase-Allele für ein NLS-LacZ kodieren, kann von der *LacZ*-Färbung nicht ohne weiteres auf das ausgeschaltete Connexin geschlossen werden. So findet sich Cx30 vorwiegend in der grauen Substanz und Cx43 in der myelinreichen Substanz.

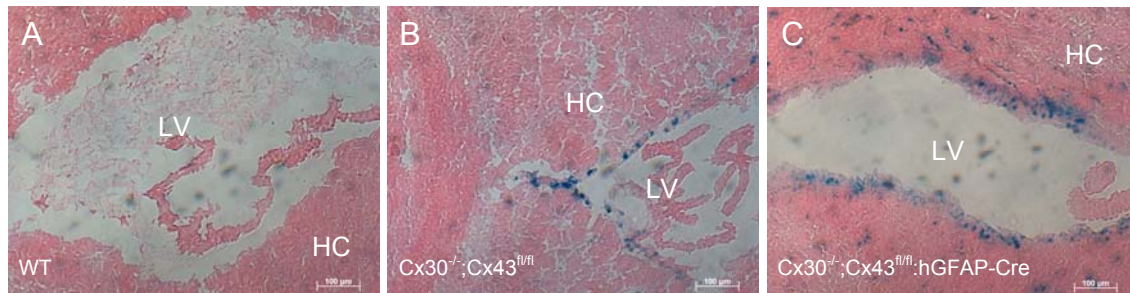


Abb. 4.26: LacZ-Färbung von Gehirnschnitten. A: Das WT-Tier diente als Negativkontrolle. B: Die Epithelzellschicht um den linken Ventrikel (LV) zeigt deutliche *LacZ*-Signale. C: Die Epithelzellschicht um den LV zeigt deutliche *LacZ*-Signale. Auch im Hippocampus (HC) sind einige schwache Signale zu sehen (Größenstandard = 100 µm).

Der Unterschied zwischen den *LacZ*-Färbungen von $Cx30^{-/-}$ - und $Cx30^{-/-};Cx43^{fl/fl}$ -hGFAP-Cre-Tieren ist nicht sehr groß. Es sollten auch bei den $Cx30^{-/-}$ Tieren *LacZ*-Signale im Hippocampus zu sehen sein, da beide Connexine im Hippocampus exprimiert werden (Theis et al., 2005). Dies scheint aber nicht immer zuverlässig der Fall zu sein, was aber auf Probleme bei der Methode zurückzuführen ist. Zuverlässiger ist es, die Funktionalität der Cre-Rekombinase mit Hilfe von Immunoblots zu überprüfen.

4.6.3 Untersuchung des Methylierungszustandes des hGFAP-Promotors

Es ist bekannt, dass eine Methylierung von Promotoren zur Herunterregulierung des Proteins führen kann, so auch beim *Cx43*-Promotor (Yi et al., 2007). Daher galt es zu überprüfen, ob ein veränderter Methylierungszustand des hGFAP-Promotors bei den Pseudo-DKO- und den DKO- vorlag. In Kooperation mit Dr. Waha (Institut für Neuropathologie, Universität Bonn) wurde die DNS aus den Gehirnen von drei Pseudo-DKO- und drei DKO-Tieren isoliert. Es wurden spezielle Startermoleküle abgeleitet und PCR-Reaktionen durchgeführt, mit deren Hilfe eine statistisch auswertbare Aussage über den Methylierungszustand der einzelnen CpG-Inseln im hGFAP-Promotor gemacht werden kann.

Die Methylierungszustände des hGFAP-Promotors in Pseudo-DKO- und DKO-Tieren sind nahezu identisch. Ein Aktivitätsverlust des hGFAP-Promotors kann somit nicht auf eine Methylierung zurückgeführt werden. Die Ursache für den Aktivitätsverlust bleibt damit weiterhin unbekannt. Umso wichtiger ist es deshalb, transgene Cre-Rekombinase exprimierende Mauslinien immer daraufhin zu überprüfen, ob diese in den untersuchten Tieren auch wirklich funktionell aktiv war.

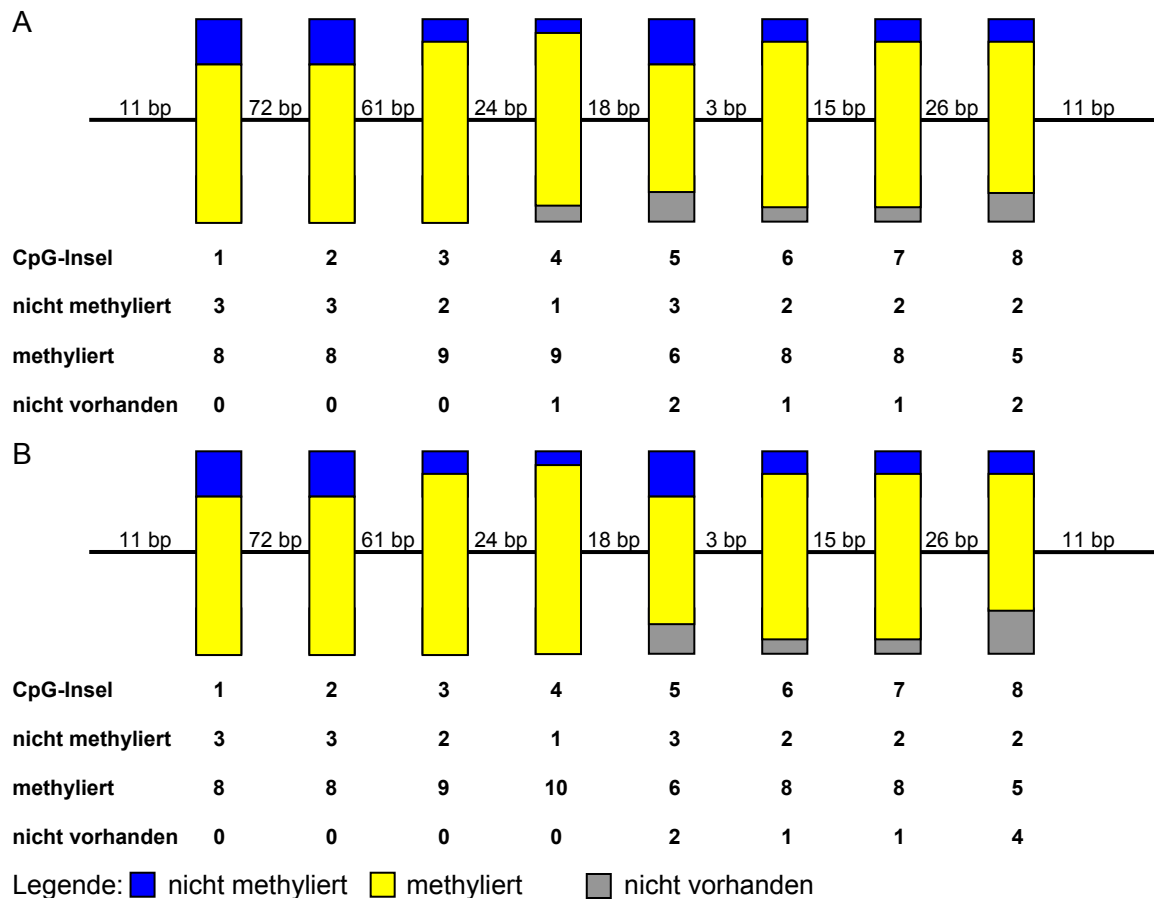


Abb. 4.27: Untersuchung der Methylierungszustände des hGFAP-Promotors. Es ist jeweils ein 600 bp langer Abschnitt des Promotors dargestellt, die 8 bekannten CpG-Inseln sind als längliche Kästen abgebildet, wobei der Methylierungszustand farblich kodiert ist. Zusätzlich wird die Länge der Abschnitte zwischen den CpG-Inseln angegeben. A: Pseudo-DKO, B: DKO.

5 Diskussion

5.1 Erzeugung verschiedener Cx43-Ablationsmutanten

Die Cx43K258stop-Maus wurde von Karen Maass in der Arbeitsgruppe von Prof. Willecke erzeugt. In dieser Mausmutante wurden die letzten C-terminalen 125 Aminosäurereste des Cx43-Proteins ablatiert (Maass et al., 2004). Aufgrund einer defekten Wasserpermeabilitätsbarriere der Haut starben die im homozygoten Zustand 3 bis 6 Tage nach der Geburt. Da neben mehreren bekannten Proteininteraktionsdomänen, darunter die ZO-1-Interaktionsdomäne, auch 15 beschriebene Phosphorylierungsstellen ablatiert wurden, kann der Phänotyp nicht auf spezifische Interaktionen zurückgeführt werden. Um die Funktion dieser Interaktionen zu untersuchen sollten deshalb gezielt bekannte Interaktionsdomänen ablatiert werden.

5.1.1 Erzeugung der Cx43D378stop-Ablationsmutante

Die Interaktion zwischen ZO-1 und Cx43 wurde 1998 beschrieben (Giepmans et al., 1998; Toyofuku et al., 1998) und ist seitdem intensiv untersucht worden. Es ist bekannt, dass ZO-1 an die letzten Aminosäurereste des C-Terminus von Cx43 bindet. Aus wie vielen Aminosäureresten die Interaktionsdomäne jedoch genau besteht, ist bisher nicht hinreichend geklärt. Zahlreichen Experimenten zufolge kann die Interaktionsdomäne nur aus der letzten bis hin zu den letzten fünf Aminosäureresten bestehen (Giepmans et al., 1998; Toyofuku et al., 1998; Barker et al., 2002; Chen et al., 2008). Um die Funktion der Interaktion zwischen ZO-1 und Cx43 genauer zu untersuchen, wurde daher eine transgene Maus erzeugt, welche die veränderte Isoform des Cx43, das Cx43D378stop-Protein, exprimiert. Gleichzeitig wurde die Cx43D378stop-Mutation im HeLa-Zellsystem untersucht.

Die Mutation Cx43D378stop wurde mittels einer Mutagenese-PCR erzeugt (unter Abschnitt 4.1 beschrieben). Die verwendeten Startermoleküle wurden so gewählt, dass die letzten 15 Basen, die wiederum für die letzten 5 Aminosäurereste des Cx43 kodieren, aus der WT *Gja1*-Sequenz deletiert wurden.

5.1.2 Erzeugung der Cx43_(Δ234-243)-Ablationsmutante zur Ablation der Tubulin-Interaktionsdomäne des Cx43-Proteins

Die Rolle der Interaktion von Cx43 und Tubulin wurde 2001 beschrieben (Giepmans et al., 2001). Ein Abschnitt von 35 Aminosäureresten des Cx43-Proteins zeigt eine hohe Affinität zu Tubulin, die eigentliche Interaktionsdomäne besteht jedoch aus den Aminosäureresten 234 bis 243. Es gibt Hinweise, dass nicht alle zehn Aminosäurereste zur Tubulin-Bindung benötigt werden, um einen Transport des Cx43 über das Mikrotubulizytoskelett zur

Plasmamembran zu gewährleisten (Segretain et al., 2004; Nambara et al., 2007; Shaw et al., 2007). Um herauszufinden, ob der Verlust der Interaktionsdomäne ausreicht, den Transport des Cx43 zur Plasmamembran vollständig zu unterbinden, wurden zehn Aminosäurereste der Tubulin-Interaktionsdomäne des Cx43 mit Hilfe der entsprechenden Cx43-Ablationsmutante im HeLa-Zellsystem ablatiert. Die Mutation wurde, wie unter Abschnitt 4.1 beschrieben, mit Hilfe der PCR-Mutagenese erzeugt.

5.1.3 Erzeugung der Cx43_(Δ253-256)-Ablationsmutante zur Ablation der CIP85-Interaktionsdomäne des Cx43-Proteins

Das Protein CIP85 interagiert über eine SH3-Domäne mit Cx43 über die Aminosäurereste 253 bis 256 (Lan et al., 2005). Die Erzeugung von CIP85-Ablationsmutanten diente der Bestimmung der Interaktionsdomäne mit Cx43. Ein Austausch der Proline 253 und 256 des Cx43 gegen Alanine führte zu einem Verlust der Interaktion zwischen CIP85 und Cx43. Dieser Interaktionsverlust bewirkte, dass sich im Vergleich zu Cx43WT-Zellen größere Cx43-Plaques in der Plasmamembran bildeten und sich die Halbwertszeit von Cx43 in HEK- und HeLa-Zellen erhöhte (Lan et al., 2005). Diese Beobachtungen ließen die Schlussfolgerung zu, dass CIP85 eine Rolle beim lysosomalen Abbau von Cx43 spielt. Nach der Ablation der CIP85-Interaktionsdomäne sollten daher Kopplung, Lokalisation und Halbwertszeit in HeLa-Zellen untersucht werden. Die Cx43_(Δ253-256)-Ablationsmutante wurde durch PCR-Mutagenese erzeugt (unter Abschnitt 4.1 beschrieben).

5.2 Klonierung und Einsatz der Vektoren

Bevor die verschiedenen HeLa-Vektoren und der konditionale Knock-In-Vektor eingesetzt werden konnten, war es notwendig, Eigenschaften und Positionen der verwendeten Sequenzen zu charakterisieren. Die Vor- und Nachteile der relevanten Sequenzen und fertigen Vektoren werden im Folgenden kurz vorgestellt.

5.2.1 Verwendung einer IRES Sequenz

Die IRES-Sequenz wurde zwischen den jeweiligen *Gja1*-Sequenzen der Cx43-Deletionsmutanten und dem Reportergen für eGFP eingesetzt. Dadurch sollte gewährleistet werden, dass neben den Cx43-Proteinen auch eGFP exprimiert wird. Um eine optimale Nutzung der IRES sicherstellen zu können, müssen einige Voraussetzungen erfüllt werden. So sollte der Abstand zwischen dem Stop-Codon des 5' gelegenen Proteins und der IRES 70 bis 100 bp betragen, zwischen dem Ende der IRES-Sequenz und dem ATG des 3' gelegenen Proteins sollte sich ein Abstand von 1 bis 95 bp befinden (Attal et al., 1999).

Der Abstand zwischen der IRES und dem eGFP beträgt bei allen in dieser Arbeit beschriebenen Vektoren 49 bp. Die Abstände zwischen der mutierten *Gja1*-Sequenz und der IRES-Sequenz variieren, von 84 bp beim Cx43D378stopKI-Vektor über 81 bp beim HeLa-Cx43D378stop-Vektor bis 102 bp bei den HeLa-Cx43Mut-Vektoren.

Schwierigkeiten bereitete das Einbringen der *Gja1*-Sequenzen vor die IRES-Sequenz. Dieses Problem war bereits aus anderen Klonierungsprojekten bekannt (mündliche Mitteilung, O.Tress und M.Schütz) und wurde auf die Sekundärstrukturen zurückgeführt.

In der Literatur wurde sowohl die Möglichkeit einer intrinsischen Promotoraktivität (Han et al., 2002), als auch eine zu starke Bindung der Ribosomen beschrieben. Dies würde zu einer starken Expression des Reportergens und zu einer schwachen Expression des ersten Gens führen. Möglicherweise lag genau dieser Fall bei der Selektion der HeLa-Cx43D378stop-Klone vor, die zwar eine homogene Expression des eGFP zeigten, aber keine nachweisbare Expression des Cx43D378stop-Proteins.

Die mögliche intrinsische Promotoraktivität der in dieser Arbeit verwendeten IRES-Sequenz wurde in der Diplomarbeit von Stefan Maschke (2005) untersucht, ergab aber keine verwertbaren Resultate.

5.2.2 Verwendung des Reportergens eGFP

Die Verwendung eines Reportergens erlaubte die Durchführung von Expressionanalysen in verschiedenen Geweben. eGFP besitzt den Vorteil, dass es im Gegensatz zu CFP und YFP lange photostabil bleibt und leicht zu detektieren ist. Das erleichtert die Untersuchung mit fluoreszenzmikroskopischen Methoden. Organe, die auf die Expression des eGFP untersucht werden sollen, können direkt nach der Entnahme aus der Maus oder auch erst nach der weiteren Behandlung der Gewebe (z.B. nach Anfertigung von Kryoschnitten) begutachtet werden. Hierin zeigt sich auch der Vorteil des Reportergens LacZ, das erst nach einer entsprechenden Färbung und nur in Schnitten oder „Whole-Mount“-Präparaten nachgewiesen werden kann. Die Angabe über die Toxizität des eGFP ist durch die Literatur nicht eindeutig zu beantworten. Während eine Arbeitsgruppe einen toxischen Effekt durch die Akkumulation von eGFP aufzeigte (Slice et al., 1998), konnten andere diesen nicht nachweisen (Smith et al., 1997; Liu et al., 1999). Im Rahmen seiner Diplomarbeit untersuchte Radek Dobrowolski (2004) den Einfluss von eGFP und d2eGFP auf HeLa-Zellen (im zweitgenannten Protein ist die Halbwertszeit stark reduziert), und konnte keinen Unterschied in der Sterblichkeit oder der Wachstumsgeschwindigkeit feststellen. Aus diesem Grund wurde in dieser Arbeit die stabilere Form des eGFP für alle Vektoren verwendet.

5.2.3 Verwendung des Antibiotikums Zeozin

Antibiotika wurden eingesetzt, um die Selektion transfizierter Zellen zu ermöglichen. Es überleben nur die Zellen, die den eingebrachten Vektor aufgenommen haben, auf welchem das entsprechende Gen zur Resistenz liegt. Für die Selektion der HeLa-Cx43D378stop-Zellen wurde das Antibiotikum Zeozin verwendet. Ungefähr zehn Tage nach Beginn der Selektion fangen die nicht resistenten Zellen zu sterben an, so dass kleine Zellhaufen (Klone) resistenter Zellen sichtbar werden. Es wurden mehrere Versuche unternommen, eine stabil Cx43D378stop exprimierende HeLa-Zell-Linie zu erzeugen. Über 500 Klone wurden gepickt und analysiert, ohne jedoch einen stabilen HeLaCx43D378stop-Klon zu erhalten, der eine ausreichende Menge des Cx43D378stop-Proteins exprimierte. Nur einige der untersuchten Klone zeigten eine Expression des Reportergens eGFP. In den wenigen Klonen, in denen über 70 % aller Zellen eine eGFP Expression zeigten, konnte keine Expression des Cx43D378stop-Proteins (weder durch Immunfluoreszenz noch Immunoblot) nachgewiesen werden. In der Literatur ist beschrieben, dass Zeozin in Abhängigkeit der eingesetzten Konzentration Brüche in der DNS verursachen kann (Hwang et al., 2005, Chankova et al., 2007). Deshalb wurde angenommen, dass es durch Zeozin verursachte DNS-Brüche gab. Dabei wurden die IRES-Sequenz und das eGFP-Gen nicht beschädigt, aber das *Gja1*D378stop-Gen könnte so beeinträchtigt worden sein, dass die Expression des Cx43D378stop-Proteins verhindert oder stark reduziert wurde. Bei einer Wiederholung des Versuches wäre es von Vorteil, mit Hilfe von Immunfluoreszenzen die Klone auf die Expression von Cx43D378stop und nicht im Hinblick auf die eGFP-Expression zu untersuchen. Weiterhin sollte ein anderes Antibiotikum zur Selektion eingesetzt werden. Aus diesem Grund wurde bei der Erzeugung der HeLa-Cx43_(Δ234-243)⁻ und HeLaCx43_(Δ253-256)⁻ Zellen auf Zeozin als Selektionsantibiotikum verzichtet, stattdessen wurde eine Resistenzkassette gegen Blastizidin verwendet (siehe Abb. 4.4). Zudem wurden die Zellklone bei der Erzeugung der stabilen HeLa-Cx43_(Δ234-243)⁻ und Cx43_(Δ253-256)⁻ Zell-Linien mit Hilfe von Immunfluoreszenzen auf die Expression der mutierten Cx43-Proteine analysiert.

5.2.4 Die HeLa-Vektoren

Die Klonierung des Vektors HeLaCx43D378stop erfolgte wie unter Abschnitt 4.2.1.1 beschrieben. Allerdings wurde er aufgrund der unter den Abschnitten 4.2.3 und 5.2.3 aufgeführten Gründe im Rahmen dieser Arbeit für transiente Transfektionen verwendet. Hier zeigte sich, dass das Cx43D378stop-Protein in der Plasmamembran und das eGFP im Zytoplasma (siehe Abb. 4.6 und 4.7B) exprimiert wurden, was für die prinzipielle Funktionalität der *Gja1*D378stop-IRES-eGFP-Kassette spricht.

Bei der Verwendung der Vektoren HeLaCx43_(Δ234-243) und HeLaCx43_(Δ253-256) wurde gezeigt, dass die jeweilige mutierte Form des Cx43-Proteins exprimiert wurde (siehe Abb. 4.7C und

D). Die analysierten Klone zeigten eine homogene Expression in über 90 % der Zellen, eine eGFP-Expression fand jedoch nicht statt (siehe Abb. 4.11C und D). Da durch die lange Zellkultur die Aktivität der Promotoren aus unbekannten Gründen immer stärker nachließ, wurden für die späteren Analysen Klone aufgetaut, die unmittelbar nach der Expandierung eingefroren worden waren.

5.2.5 Der Cx43D378stopKI-Vektor

Die Klonierung eines konditionalen Knock-In-Vektors ermöglicht die Verpaarung der transgenen Cx43D378stop-Tiere mit Tieren, die Träger von Flp- und Cre-Rekombinasen sind. Dadurch kann das Cx43D378stop-Protein gezielt in bestimmten Geweben exprimiert werden. Der Mechanismus der homologen Rekombination ist in Abb. 1.5.1 dargestellt. Bevor der Cx43D378stopKI-Vektor jedoch Verwendung bei der Elektroporation fand, wurde er ausgiebig charakterisiert (unter Abschnitt 4.3 beschrieben) und zusätzlich durch Sequenzierung überprüft.

5.3 Untersuchungen der Cx43-Ablationsmutanten in HeLa-Zellen

5.3.1 Untersuchungen des Cx43D378stop-Proteins in HeLa-Zellen

In transient Cx43D378stop exprimierenden HeLa-Zellen konnte nachgewiesen werden, dass das Cx43D378stop-Protein eindeutig in Kontaktmembranen benachbarter Zellen eingelagert wird (siehe Abb. 4.7B). Beim Transport zur Plasmamembran wurde kein Unterschied zum Cx43WT-Protein festgestellt. Ob die Cx43D378stop-Plaques im Vergleich zu Cx43WT-Plaques größer waren, ließ sich anhand der transient transfizierten Zellen nicht beantworten. Weiterhin lassen sich keine Aussagen darüber treffen, ob ZO-1 in HeLa-Zellen die Aufgabe eines „gatekeepers“ ausübt (Hunter et al., 2005; Gourdie et al., 2006), d.h. ob es einen Einfluss darauf hat, wie viel Cx43D378stop-Protein in die Plasmamembran eingelagert wird. Jiong Zhang ist es während seiner Diplomarbeit gelungen, stabil exprimierende Cx43D378stop HeLa-Zellen zu erzeugen. Dafür wurde, der in dieser Arbeit beschriebene HeLaCx43D378stop-Vektor (siehe Abschnitt 4.2.1.1) umklont. Der verwendete Vektor trägt das Puromycin-Resistenzgen. In den HeLaCx43D378stop-Zellen zeigte sich eine Lokalisation in den Kontaktmembranen. Die Kopplung der HeLaCx43D378stop-Zellen ist im Vergleich zu Cx43WT-Zellen um das zehnfache niedriger (mündliche Mitteilung, J. Zhang, 2008).

5.3.2 Untersuchungen des Cx43_(Δ253-256)-Proteins in HeLa-Zellen

In HeLa-Zellen bildet das Cx43_(Δ253-256)-Protein plaqueähnliche Strukturen in den Kontaktmembranen benachbarter Zellen aus, zusätzlich ist das Cx43_(Δ253-256)-Protein in größeren

Mengen im Zytoplasma zu finden (siehe Abb. 4.7D). Die Lokalisation im Zytoplasma ließe sich auf zwei Ursachen zurückführen. Zum einen könnte es sich um endozytiertes Cx43 handeln, das nicht über den lysosomalen Weg abgebaut werden kann (Lan et al., 2005) und sich deshalb im Zytoplasma akkumuliert. Die andere Möglichkeit wäre, dass das Cx43 vom Golgi-Netzwerk nicht weiter zur Plasmamembran transportiert wird. Bereits beschrieben wurde, dass die Aminosäurereste zwischen 251 und 257 für den Transport zuständig sein könnten. Martinez et al. (2003) konnten eine ähnliche Verteilung der Lokalisation für ein Cx43 Δ 251-Protein zeigen, während das Cx43K258stop-Protein zur Plasmamembran transportiert wird (Maass, 2004). Es könnte sich um eine Domäne handeln, die neben der Tubulinbindedomäne für den Transport von Cx43 wichtig ist. Bisher wurde jedoch kein Transportmechanismus für Cx43 beschrieben, der unabhängig vom Mikrotubulizytoskelett und seinen assoziierten Transportproteinen ist. Eine Bindung von p120-Catenin mit Cx43 wurde beschrieben (Xu et al., 2001). P120 bindet an Kinesin und beeinflusst die Geschwindigkeit von Cadherinhaltigen Vesikeln beim Mikrotubuli-assoziierten Transport (Chen et al., 2003). Eine Möglichkeit wäre, dass nicht nur CIP85 an die Aminosäurereste 253 bis 256 bindet, sondern auch p120-Catenin oder ein anderes Protein, welches Cx43 mit dem Mikrotubulizytoskelett und dem assoziierten Vesikeltransport verbindet. Das trotzdem ein geringer Anteil des Cx43-Proteins zur Plasmamembran gelangt, könnte auf einen Transportweg hinweisen, der von den Mikrotubuli unabhängig ist. Weitere Untersuchungen sollten dies noch belegen.

Im Immunoblot (siehe Abb. 4.9) ist zu erkennen, dass die Anteile der P1- und P2-Zustände viel schwächer ausgebildet sind als bei Cx43WT. Dies könnte mit der geringeren Menge von Cx43 $_{(\Delta 253-256)}$ an den Kontaktmembranen zusammenhängen, da Cx43 auf dem Weg zur Plasmamembran und in der Plasmamembran phosphoryliert wird, wodurch die P1- und P2-Isoformen entstehen (Solan et al., 2007). Eine Phosphorylierung von Serin 255 spielt keine bekannte Rolle bei der Ausbildung der P1- und P2-Isoformen und ist somit keine Erklärung für die nicht vorhandenen P1 und P2 Isoformen. Obwohl im Vergleich zum Cx43WT-Protein nur vier Aminosäurereste fehlen – ein Unterschied von gerade einmal 0,4 Da – wandert das Cx43 $_{(\Delta 253-256)}$ -Protein schneller in der SDS-PAGE als das Cx43WT-Protein. Wahrscheinlich sind Veränderungen der Sekundärstruktur, ein Unterschied der Ladungsverteilung, oder eine geringere Phosphorylierung für die unterschiedlichen Wanderungsgeschwindigkeiten verantwortlich.

Bei Kopplungsanalysen mit Cx43 $_{(\Delta 253-256)}$ -HeLa-Zellen wurde eine starke Reduktion der Kopplung nachgewiesen – im Vergleich zu Cx43WT ist sie um das sechsfache im Falle von Neurobiotin und um das 10 fache bei der Verwendung von Lucifer Yellow reduziert. Durch die stark geschwächte Kopplung wird der Transport von größeren Molekülen (Lucifer Yellow) stärker behindert als der von kleineren Molekülen (Neurobiotin). Die Phosphorylierung von

Serin 255 und die dadurch verringerte Gap Junction-Kommunikation wurde bereits beschrieben (Pahujaa et al., 2007). Die Kinase CDC2 gelangt während der Mitose zur Plasmamembran, phosphoryliert dort die Serine 255 und 262 und führt dadurch zu einem Verschluss der Cx43-Kanäle. Auch die Phosphorylierung des Serins 255 durch die MAPK schließt die Kanäle. Der Verlust dieser Phosphorylierungsstelle hat somit einen ähnlichen Effekt wie die Phosphorylierung selbst und scheint zu strukturellen Änderungen und somit zu einem Verschluss der Kanäle zu führen. Wie diese mögliche strukturelle Änderung genau aussieht, lässt sich anhand der durchgeführten Experimente nicht analysieren. Eine Veränderung des „Ball und Kette“-Modells jedoch ist unwahrscheinlich, da alle daran beteiligten Aminosäurereste weit von der CIP85-Interaktionsdomäne entfernt liegen (Hirst-Jensen et al., 2006).

Ein Pulse-Chase-Experiment weist darauf hin, dass die Halbwertszeit des Cx43_(Δ253-256)-Proteins gegenüber dem Cx43WT-Protein verlängert ist (Daten nicht gezeigt). Dies entspräche den bei Lan et al. (2005) beschriebenen Ergebnissen und weist darauf hin, dass der Abbau des Cx43_(Δ253-256)-Proteins verlangsamt ist.

5.3.3 Untersuchungen des Cx43_(Δ234-243)-Proteins in HeLa-Zellen

Die eigentliche Tubulinbindedomäne von Cx43 besteht aus den Aminosäureresten 234 bis 243 (Giepmans et al., 2001). Es wurde jedoch beschrieben, dass auch die Aminosäurereste 234 bis 238 für einen normalen Transport zur Plasmamembran ausreichen, da das mutierte Cx43Δ239-Protein in HeLa-Zellen in die Membran integrierte (Nambara et al., 2007). Dagegen konnte nach Ablation der potenziellen Interaktionsdomäne von CIP150 (Aminosäurereste 227 bis 242) (Akiyama et al., 2005) das Cx43-Protein nicht mehr zur Plasmamembran transportiert werden. In der Immunfluoreszenzanalyse zeigen diese Zellen das gleiche Bild wie die Cx43_(Δ234-243)-HeLa-Zellen (siehe Abb. 4.7C). Cx43_(Δ234-243) ist nur im Zytoplasma lokalisiert, plaqueähnliche Strukturen sind nicht nachzuweisen.

Im Immunoblot ist zu erkennen, dass Cx43_(Δ234-243) schneller als die Cx43WT-Bande im SDS-PAGE läuft (siehe Abb. 4.9). Übereinstimmend mit den Beobachtungen von Akiyama et al., 2005, fehlen die P1- und P2-Banden. Cx43 wird während des Transports zur Plasmamembran phosphoryliert (Solan et al., 2007) – ohne Phosphorylierungen findet, wie beim Cx43_(Δ234-243)-Protein, kein Transport statt.

Trotzdem werden die Farbstoffe in einige benachbarte Cx43_(Δ234-243)-Zellen transportiert (siehe Abb. 4.11 und 4.12), was darauf hindeutet, dass es doch einige funktionelle Kanäle in den Kontaktmembranen gibt. Allerdings scheint es sich entweder um einzelne Kanäle oder sehr kleine Plaques zu handeln, da diese mit lichtmikroskopischen Methoden nicht nachgewiesen werden konnten (siehe Abb. 4.7). Vielleicht spielt die putative Interaktionsdomäne für p120-Catenin oder ein noch unbekanntes Protein zwischen den

Aminosäureresten 251 und 257 beim Transport zur Plasmamembran eine Rolle, wie unter Abschnitt 5.3.2 beschrieben. Im Gegensatz dazu wurde in der Cx43 Δ 227-242-Ablationsmutante keinerlei Kopplung festgestellt (Akiyama et al., 2005). Allerdings wurden dort nur größere Farbstoffe als Neurobiotin verwendet, zudem fehlt ein Teil der vierten Transmembrandomäne. Nicht auszuschließen ist daher, dass die Strukturveränderungen so stark ausgeprägt sind, dass sie zum kompletten Verschluss der Kanäle führen.

5.4 Southernblot-Analyse der PCR positiven ES-Zellklone

Es ist notwendig, eine homologe Rekombination mit Hilfe einer Southernblot-Analyse zu beweisen. Durch die starke interne Homologie des Cx43D378stopKI-Vektors, bestehend aus zwei bis auf 15 Basen identischen *Gja1*-Sequenzen und Teilen des 3'-Homologiebereiches (siehe Abb. 4.15), war die Ausbeute homolog rekombinierter Klone sehr gering. Von den 567 getesteten ES-Klonen waren 90 positiv für die 5'-loxP-Stelle und davon wiederum 83 positiv für die 3' gelegene eGFP-Kassette. Dies entspricht einem prozentualen Anteil von 15 % aller untersuchten Klone. Da die Mehrzahl der Klone die erwarteten Fragmente nicht zeigten, wurde angenommen, dass der Vektor wahrscheinlich zerbrochen ist. So integrierten die 5' gelegene loxP-Stelle mit der *Gja1*WT-Sequenz und die eGFP-Kassette mit der 3'-Homologie ins Genom, während der mittlere Teil des Vektors, bestehend aus der *Gja1*D378stop-Sequenz, nicht integrierte. Lediglich die Klone 200 und 382 konnten als positiv rekombiniert bestätigt werden; dies entspricht einer Rekombinationsrate von 0,35 %. In späteren Analysen sollte daher – bei einer hohen Anzahl von ES-Klonen – die Länge einer internen Homologie so gering wie möglich gehalten werden.

5.5 Hemizygote Cx43^{del/flD378stop}: α MHC-Cre und homozygote Cx43^{flD378stop/flD378stop}: α MHC-Cre Tiere mit früher postnatalen Letalität

Im Gegensatz zu hemizygoten normal lebensfähigen Cx43^{del/K258stop}-Mäusen (Maass et al., 2007) sterben hemizygote Cx43^{del/flD378stop}: α MHC-Cre-Tiere innerhalb von 48 Stunden nach der Geburt (siehe Abb. 4.24). Die α MHC-Cre-Rekombinase ist spezifisch nur im Herzen aktiv und bedingt daher nur dort die Expression des Cx43D378stop-Proteins, während das Cx43K258stop-Protein in der ganzen Maus exprimiert wird. Selbst im Vergleich zu homozygoten Cx43^{K258stop/K258stop}-Tieren, die nach drei bis fünf Tagen aufgrund einer defekten Wasserpermeabilitätsbarriere der Haut sterben (Maass et al., 2004), ist der Unterschied enorm. Damit verursacht der Verlust der ZO-1-Interaktionsdomäne des Cx43 im Herzen einen stärkeren Phänotyp als die Ablation der letzten 125 Aminosäurereste des C-Terminus von Cx43. Cx43KO-Mäuse sterben ebenfalls direkt nach der Geburt (Reaume et al., 1995) und sind von allen beschriebenen Cx43-Mausmutanten im Hinblick auf den Zeitpunkt des

eintretenden Todes der Neugeborenen am ehesten mit den Cx43^{del/flD378stop}: α MHC-Cre- und Cx43^{flD378stop/flD378stop}: α MHC-Cre-Tieren zu vergleichen. Tiere mit dem Genotyp Cx43^{fl/fl}: α MHC-Cre sterben innerhalb der ersten 16 Tage nach der Geburt und zeigen Veränderungen sowohl in der Amplitude als auch in der Geschwindigkeit des QRS-Komplexes (Eckhardt et al., 2006). Es tritt deutlich hervor, dass eine komplette Deletion des Cx43 im Herzen einen geringeren Einfluss auf die Überlebensfähigkeit der Tiere hat als die Ablation der letzten fünf Aminosäurereste und somit der ZO-1-Interaktionsdomäne des Cx43. Wie bereits im Abschnitt 4.5.2 erwähnt, übt das Cx43D378stop-Allel im Herzen keinen dominanten Effekt aus, wenn ein Cx43WT-Allel vorhanden ist.

Die Ursachen für das schnelle Versterben der hemizygoten Cx43^{del/flD378stop}: α MHC-Cre- und der homozygoten Cx43^{flD378stop/flD378stop}: α MHC-Cre-Tiere nach der Geburt müssen noch gefunden werden. Im Folgenden werden dafür mehrere mögliche Ansatzpunkte diskutiert.

Die Menge von Cx43 im Herzen spielt eine entscheidende Rolle bei der Repolarisierung der Plasmamembranen und der Erhaltung der Herzschlagfrequenz (Kontogeorgis et al., 2008). Die im krankhaften Herzen oft modifizierte Menge des Cx43 führt zu elektrophysiologischen Veränderungen. Ist die Menge des Cx43 um 95 % verringert, können Tachykardien im Herzen u.a. zu Beeinträchtigungen der Reizweiterleitung führen (van Rijen et al., 2004). Die Deletion eines Allels des *Gja1* bewirkt eine Reduktion von 50 % des Cx43-Proteins in Arterien – genug für die Auslösung von Arrhythmien (Thomas et al., 1998). Das Vorhandensein einer unter der Kontrolle des endogenen *Gja1*-Promotors stehenden loxP-Stelle verringert die Expression des darauffolgenden Gens um 50 % im Vergleich zu einem WT-Allel (Theis et al., 2004). Wie bereits im Abschnitt 5.3.1 erwähnt, konnte J. Zhang zeigen, dass die Kopplung in Cx43D378stop exprimierenden HeLa-Zellen im Vergleich zu Cx43WT-HeLa-Zellen um 90 % reduziert ist. Ist dieses Ergebnis auf die Kopplung zwischen Kardiomyozyten übertragbar, was noch zu zeigen ist, dann liegt die Kopplung sowohl in hemizygoten Cx43^{del/flD378stop}: α MHC-Cre- als auch in homozygoten Cx43^{flD378stop/flD378stop}: α MHC-Cre-Tieren unter bzw. genau bei den von van Rijen (2003) postulierten 95 % Reduktion. Tachykardien und anschließende Arrhythmien mit Todesfolge wären die logische Konsequenz (van Rijen et al., 2003; Kontogeorgis et al., 2008). Folgerichtig würden diese Herzrhythmusstörungen zu einem früheren Tod als bei einer kompletten Deletion des Cx43 im Herzen führen (Eckhardt et al., 2004 und 2006).

Ob der vergleichbare Zeitpunkt des Sterbens bei hemizygoten Cx43^{del/flD378stop}: α MHC-Cre-, homozygoten Cx43^{flD378stop/flD378stop}: α MHC-Cre- und Cx43KO-Tieren (Reaume et al., 1995) ebenfalls auf eine morphologische Änderung zurückzuführen ist, wird zur Zeit von Dr. Jung-Sun Kim (Detroit, USA) untersucht. Da der Verschluss des rechtsventrikulären Ausflusstraktes des Herzens bei Cx43KO-Mäusen zu Behinderungen des Blutkreislaufes führt (Reaume et al., 1995), wird besonders auf dessen Morphologie geachtet. Auslöser

morphologischer Veränderungen könnte die fehlende Interaktion zwischen Cx43 und ZO-1 und die damit einhergehenden möglichen Variationen in einem oder mehreren Signalwegen in Cx43D378stop-Tieren sein. Ein in Frage kommendes Protein für einen veränderten Signalweg wäre das Protein ZONAB („ZO-1 assoziiertes Nukleinsäurebindendes Protein“), das mit ZO-1 über eine SH3-Domäne interagiert (Tsapara et al., 2006) und ein Transkriptionsfaktor ist (Balda et al., 2000). ZONAB interagiert mit der CDK 4 („Cell division kinase 4“) in einem zelldichteabhängigen Prozess und ist entscheidend an der Proliferation von Epithelzellen (Balda et al., 2003) beteiligt. Bindet ZO-1 an ZONAB, verbleibt dieses im Zytosol und dessen transkriptionale Aktivität wird damit inhibiert (Tsapara et al., 2006). Bisher ist nur ein Einfluss von TJs auf ZONAB und die Zellproliferation beschrieben (Sourisseau et al., 2006). Da aber ZO-1 ebenfalls ein Bestandteil von GJs ist, könnte ein solcher Signalweg auch, über Cx43 vermittelt, von Gap Junctions ausgehen. Zudem wurde für Cx43, wie für ZO-1, eine Tumorsuppressorfunktion beschrieben (Temme et al., 1997; Omori et al., 1999; Balda et al., 2003; Dang et al., 2003; Zhang et al., 2003), welche möglicherweise durch die Bindung an ZO-1 ausgeübt wird. Es müsste demzufolge untersucht werden, ob eventuell vorhandene morphologische Veränderungen in Cx43D378stop exprimierenden Herzen mit einer im Vergleich zu WT-Herzen abweichenden Zellanzahl einhergehen.

Die bereits oben erwähnte Reduktion der Kopplung in HeLa-Cx43D378stop-Zellen könnte auf das „Ball und Kette“-Modell (Duffy et al., 2002) hinweisen, das in Cx43D378stop exprimierenden Zellen verändert ist. Im Cx43D378stop-Protein fehlen zwei zur zytoplasmatischen Schleife hoch affine (Hirst-Jensen et al., 2006) Aminosäurereste 378 und 379, wodurch vermutlich die Interaktion zwischen dem C-Terminus und der zytoplasmatischen Schleife beeinflusst wird. Es wurde gezeigt, dass eine Ablation des C-Terminus von Cx43 als Bestandteil des „Ball und Kette“-Modells den Übergang vom offenen zum geschlossenen Zustand erschwert. Der C-Terminus hat daher nachweislich die Funktion, für den schnellen Übergang zwischen „Offen“ und „Geschlossen“ zu sorgen (Moreno et al., 2002). Auch bei Cx43K258stop-HeLa-Zellen war deutlich zu erkennen, dass in beiden untersuchten Ablationen (Cx43K258stop und Cx43 Δ 257) die Kanäle häufiger geöffnet als geschlossen waren und ein Ruhezustand der Kanäle nicht mehr erreicht wurde (Moreno et al., 2002; Maass et al., 2004).

Der Einfluss der Bindung von ZO-1 und Src an Cx43 und die damit verbundenen Veränderungen der GJC wurden bereits in den Abschnitten 1.2.2.1 und 1.2.3 beschrieben. Src wird in vielen Geweben exprimiert (Kostyniuk et al., 2002), auch in den bei der Untersuchung der Interaktion zwischen Cx43 und ZO-1 besonders im Blickpunkt stehenden Geweben wie dem Gehirn (Wu et al., 2008), der Haut (Honda et al., 2007) und dem Herzen (Puceat et al., 1998).

Im kranken Herzen wurde eine erhöhte Menge des Cx43 mit einer Phosphorylierung am Y265 entdeckt (Toyofuku et al., 1999), zurückzuführen auf eine Phosphorylierung durch Src (Giepmans et al., 2001, Toyofuku et al., 2001), die zu einer Herunterregulierung der GJC führt. Es wurde herausgefunden, dass die Phosphorylierung von Y265 nur die GJC beeinflusst, nicht aber die Proliferation, Adhäsion und Migration von Fibroblasten (Lin et al., 2006). Dies könnte eventuelle letale elektrophysiologische Veränderungen in Cx43D378stop exprimierenden Tieren erklären. Morphologische Unterschiede im Herzen wären hierbei nicht zu erwarten. Durch Src oder durch Src beeinflusste Kinasen phosphorylieren folgende Aminosäurereste des C-Terminus: Y247, S255, S262, Y265, S279, S282, S368 und S372. Sie alle führen zu einer Herunterregulierung der GJC (Pahujaa et al., 2007; Solan et al., 2008). Diese Phosphorylierungen wurden *in vitro* bei niedrigen pH-Werten nachgewiesen, während bei einem pH-Wert von 7,4 keine Interaktion mit Src (Duffy et al., 2004; Sorgen et al., 2004), dafür aber mit ZO-1 stattfindet. Die Interaktion zwischen ZO-1 und Cx43 scheint nicht vom pH-Wert abhängig zu sein (Duffy et al., 2004; Sorgen et al., 2004). Die Bindung der SH3-Domäne von Src verursacht strukturelle Änderungen in den Aminosäureabschnitten 264-287, 306-316, 331-337, 356-359 und 367-372, wodurch eine Bindung von ZO-1 verhindert wird (Sorgen et al., 2004). In einem neueren Bindungsmodell, das in ischämischen Herzen untersucht wurde, konkurrieren Cx43 und Src um die Bindung an ZO-1. Die SH3-Domäne von Src bindet an die PDZ2-Domäne von ZO-1. Alle diese Bindungen und Veränderungen, die durch Src am C-Terminus des Cx43 ausgeübt werden, sind auch für das Cx43D378stop-Protein denkbar, da die entsprechenden Aminosäurereste nicht verändert wurden und die Ablation der letzten fünf Aminosäurereste vermutlich keine strukturellen Veränderungen des C-Terminus verursacht. Es wäre demnach möglich, dass es in den Cx43D378stop exprimierenden Tieren zu einer Bindung und Phosphorylierung des mutierten Cx43 durch Src und in Folge dessen zu einer Herunterregulierung der GJC kommt. Dies könnte eine stark beeinträchtigte oder gar komplett unterdrückte Reizweiterleitung im Herzen bewirken. Da der bekannte Src-Antagonist ZO-1 nicht an das Cx43D378stop-Protein binden kann, wird vielleicht die Bindung mit Src auch bei einem höheren pH-Wert langsam oder gar nicht aufgehoben. Auch der Unterschied zur Cx43K258stop-Maus ließe sich anhand der Bindung von Src an Cx43 erklären. Da bis auf Y247 und das S255 alle Bindungsdomänen und Phosphorylierungsstellen im Cx43K258stop fehlen, käme es nicht zu einer negativen Beeinflussung der GJC, so dass für offene Kanäle in den Kardiomyozyten und eine ausreichende Reizweiterleitung in Cx43^{del/K258stop}-Tieren gesorgt wäre. Vor kurzem wurde beschrieben, dass ZO-1 und ZO-2 als Bindeproteine mit dem Src/Csk-Komplex in Verbindung stehen und einen Einfluss auf die Transformation und Aktivierung von Src ausüben (Saito et al., 2008). Möglicherweise ist die Interaktion zwischen Cx43 und ZO-1 entscheidend für den Einfluss von ZO-1 auf Src; das Fehlen dieser

Interaktion in Cx43D378stop exprimierenden Tieren könnte die Eigenschaften der Beziehung von ZO-1 und Src verändern.

Möglicherweise ist ein anderes Protein für den beobachteten Phänotyp verantwortlich. So könnte ein eventueller Verschluss der Kanäle auch auf nicht vorhandene Phosphorylierungen zurückzuführen sein. Beispielhaft sei hier die Phospholipase C β 3 angeführt (Zeijl et al., 2007), die an die PDZ3-Domäne von ZO-1 bindet. Dort verhindert sie den Abbau von Phosphatidylinositol 4,5-Bisphosphat („PtdIns[4,5]P2“) und sorgt dafür, dass die Kanäle geöffnet bleiben. Anhand der von Jiong Zhang hergestellten HeLa-Cx43D378stop-Zellen konnte gezeigt werden, dass das Cx43D378stop-Protein im SDS-PAGE schneller läuft als das Cx43WT-Protein. Die Ursache hierfür können Veränderungen im Phosphorylierungszustand, der Sekundärstruktur oder der Ladungsverteilung sein.

Eine Vielzahl von Experimenten ist noch nötig und einige sind bereits in Vorbereitung, um die oben beschriebenen Hypothesen bestätigen oder widerlegen zu können (siehe Abschnitt 6). Auch andere, noch nicht bekannte Interaktionspartner oder noch nicht untersuchte Signalwege könnten dafür verantwortlich sein, dass die Cx43D378stop exprimierenden Tiere innerhalb von 48 Stunden nach der Geburt versterben.

5.6 Überprüfung der Zuverlässigkeit der Cre-Rekombinase unter Kontrolle des hGFAP-Promotors in Cx30^{-/-};Cx43^{fl/fl}:hGFAP-Cre-Mäusen

In der Cx30^{-/-};Cx43^{fl/fl}:hGFAP-Cre-Kolonie wurden Tiere entdeckt, in denen die Funktionalität der Cre-Rekombinase unter der Kontrolle des hGFAP-Promotors nicht mehr gegeben war (siehe Abb. 4.25) (Requardt et al., 2008). Für den Verlust der Funktionalität könnten verschiedene Ursachen verantwortlich sein.

Die Methylierung des hGFAP-Promotors würde zu dessen veränderten Aktivität führen (Barresi et al., 1999). Sie wurde bei funktionellen Cx30^{-/-};Cx43^{fl/fl}:hGFAP-Cre- (DKOs) und nicht funktionellen Cx30^{-/-};Cx43^{fl/fl}:hGFAP-Cre-Tieren (Pseudo-DKO) untersucht (siehe Abb. 4.27). Dabei konnte nahezu kein Unterschied der Methylierung des Promotorbereiches festgestellt werden. Die Methylierung des hGFAP-Promotors wäre als Ursache für den Funktionsverlust daher auszuschließen. Grundsätzlich könnte aber eine andere regulatorische Region des hGFAP-Cre-Rekombinase-Gens methyliert sein, was den Unterschied der DKOs und der Pseudo-DKO bewirken würde.

Eine Veränderung des genetischen Hintergrundes innerhalb der Kolonie könnte einen Einfluss auf die Genaktivität haben. Allerdings war der genetische Hintergrund der Cx30^{-/-};Cx43^{fl/fl}:hGFAP-Cre-Tiere über einen langen Zeitraum stabil (50 % bis 87,5 % C57BL/6), ohne zu einer Veränderung der hGFAP-Promotor-Aktivität zu führen. Auch der genetische Hintergrund ist daher als Ursache des Problems auszuschließen.

Spontane transgene Neuaneordnungen (Schulz et al., 2007) sowie epigenetische Mechanismen, wie eine Umstrukturierung des Chromatins (Lee et al., 2006), sind ebenfalls als Ursache für die veränderte Aktivität der Cre-Rekombinase denkbar. Beides wurde im Rahmen dieser Arbeit nicht untersucht.

Cx30^{-/-};Cx43^{fl/fl}:hGFAP-Cre-Tiere zeigen eine eingeschränkte Pufferfähigkeit von Kaliumionen im Hippokampus und eine höhere Anfälligkeit für Epilepsie (Wallraff et al., 2006), weshalb sie Verhaltensänderungen oder Reproduktionsdefizite aufweisen könnten, die zu einer bevorzugten Zucht von Tieren mit eingeschränkter Cre-Rekombinase-Aktivität führen. Die eigentliche Ursache für den Funktionsverlust der hGFAP-Cre-Rekombinase bleibt weiter unbekannt. Aus diesem Grund sind Qualitätskontrollen auch für andere transgene Mausmodelle, die die gleichen oder ähnliche Elemente des hGFAP-Promotors (siehe Kwon et al., 2001; Bajenaru et al., 2002; Fraser et al., 2004; Casper et al., 2006; Hirrlinger et al., 2006; Ganat et al., 2006) oder eine Cre-Rekombinase unter der Kontrolle eines spezifischen Promotors beinhalten, unbedingt anzuraten. Als Kontrollmethoden kommen Immunoblots (siehe Abb. 4.25) in Frage, deren Auswertung wertvolle Hinweise auf die Aktivität der Cre-Rekombinase geben. Als hilfreich hat sich auch die Verwendung eines Reportergens erwiesen, das *in situ* detektiert werden kann (siehe Abb. 4.26). Als zuverlässige Qualitätskontrolle zeigte sich die PCR-Analyse verschiedener Hirnregionen von Cx30^{-/-};Cx43^{fl/fl}: hGFAP-Cre-Tieren (Requardt et al., 2008). Bisherige Untersuchungen konnten zeigen, dass die Funktionalität der Cre-Rekombinase unter Kontrolle des hGFAP-Promotors innerhalb eines Wurfes nicht variierte, weshalb es als ausreichend erachtet wird, ein Tier pro Wurf zu testen. Die Qualitätskontrolle sollte aber an jedem für einen Versuch verwendeten Tier durchgeführt werden.

6 Ausblick

6.1 Weitere Untersuchungen an Cx43_(Δ234-243) exprimierenden HeLa-Zellen

Die Ergebnisse dieser Arbeit untermauern die Bedeutung der Interaktion zwischen Cx43 und ZO-1 *in vivo*. Die genaue Tragweite muss – mit Hilfe der im Folgenden vorgeschlagenen Experimente – noch ermittelt werden.

Mit Hilfe der Cx43_(Δ234-243) exprimierenden HeLa-Zellen können die veränderten Funktionen des Cx43_(Δ234-243)-Proteins in einem leicht zugänglichen System weiter untersucht werden. Weil eine geringe Kopplung festgestellt wurde, sollte versucht werden, die Einzelkanäle mit Hilfe licht- oder elektronenmikroskopischer Verfahren in der Plasmamembran zu lokalisieren. Durch die Verwendung geeigneter Antikörper, wie z.B. gegen BiP als Markerprotein für das ER (Hammond et al., 1994) oder gegen das Golgi-Markerprotein 130 kDa (GM130; Nakamura et al., 1995) wäre es möglich zu klären, wo sich das zytoplasmatisch lokalisierte Cx43_(Δ234-243) Protein befindet.

Bisher wurden für das Cx43 nur Transportwege über Mikrotubuli beschrieben (Segretain et al., 2004; Shaw et al., 2007). Durch eine Behandlung der Zellen mit dem Pflanzengift Cholchizin, welches die Polymerisierung der Mikrotubuli verhindert, und anschließender Farbstoffinjektion könnten die Zellen auf eine Restkopplung untersucht werden. Nach einer Cholchizin-Behandlung sollte die schwache Restkopplung der Cx43_(Δ234-243) exprimierenden HeLa-Zellen verschwinden, da das Mikrotubulizytoskelett zerstört ist und Cx43_(Δ234-243) nicht mehr zur Plasmamembran transportiert werden kann. Sollte dennoch eine Restkopplung vorliegen, wäre dies ein Hinweis auf einen Transportweg, der nicht vom Mikrotubulizytoskelett abhängig ist. Aufschluss über das Vorliegen dieser geringen Kopplung zwischen den Zellen könnte die Herstellung einer Cx43-Ablationsmutante, in der die AS 234 - 243 und 253 - 256 ablatiert wurden, und eine anschließende Farbstoffkopplungsanalyse geben. Gleichzeitig brächte man indirekt in Erfahrung, ob der Aminosäurenabschnitt 253 bis 256 möglicherweise ebenfalls für den Transport zur Plasmamembran verantwortlich ist, z.B. über p120-Catenin (Xu et al., 2001) (siehe Abschnitt 5.3.3).

6.2 Weitere Untersuchungen an Cx43_(Δ253-256) exprimierenden HeLa-Zellen

Cx43_(Δ253-256) exprimierende HeLa-Zellen können darüber hinaus für weitere Analysen verwendet werden. Markerproteine wie BiP für das ER (Hammond et al., 1994), GM130 für den Golgi-Apparat (GM130; Nakamura et al., 1995), Annexin VI für Endosomen (Jäckle et al., 1994) und LAMP-1 („Lysosome associated membrane protein“) für Lysosomen (Chen et al., 1995) sind in der Lage, die genaue Lokalisation des hohen zytoplasmatischen Anteils des Cx43_(Δ253-256)-Proteins zu ermitteln. Ob die Interaktion zwischen Cx43 und CIP85 vollständig

inhibiert wurde, lässt sich mittels des CIP85-Antikörpers (Lan et al., 2005), einer Ko-Immunfluoreszenz- und einer Ko-Immunpräzipitationsanalyse feststellen. Eine veränderte Aktivität von Cx43_(Δ253-256)-Halbkanälen im Vergleich zu Cx43WT-Halbkanälen ließe sich anhand der Vermessung der ATP-Ausschüttung ermitteln (Dobrowolski et al., 2006). Nach einer von Peter Bedner etablierten Methode (Bedner et al., 2003) wäre eine Veränderung der Permeabilität von Cx43_(Δ253-256) Gap Junctions für cAMP direkt mit der von Cx43 Gap Junctions vergleichbar. Die ersten Hinweise auf eine längere Halbwertszeit, die es durch ein Pulse Chase Experiment gibt (siehe Abschnitt 5.3.2), sollten mit Hilfe der vorhandenen Cx43_(Δ253-256) exprimierenden HeLa-Zellen bestätigt werden.

6.3 Weitere Untersuchungen an Cx43D378stop exprimierenden Zellen

Durch das Vorhandensein der Cx43D378stop exprimierenden HeLa-Zellen, die von Jiong Zhang während seiner Diplomarbeit erzeugt wurden, ist ein leicht zugängliches Zellsystem für Versuche verfügbar, die die Analyse der Cx43D378 exprimierenden transgenen Tiere unterstützen könnten. Prof. F. Bukauskas (Albert Einstein College of Medicine, New York, USA) wird die Öffnungszustände der CX43D378stop-Kanäle genauer analysieren, und herausfinden, ob die geringere Kopplung der Zellen auf einen funktionell eingeschränkten Kanal zurückzuführen ist.

Da keine Cx43K258stop exprimierenden HeLa-Zellen mehr vorhanden sind, müssen neue Zellen dieses Typs erzeugt werden, um deren Kopplungseigenschaften genauer mit Cx43D378stop-HeLa-Zellen vergleichen zu können. Die damaligen Kopplungsanalysen (Maass et al., 2007) wurden nach einer Behandlung gegen Mycoplasmen durchgeführt, was zu Veränderungen der Expression und der Kopplungseigenschaften geführt haben könnte (persönliche Mitteilung, Karen Maass). Größe, Lokalisation und Zusammensetzung der Gap Junction-Plaques von Cx43D378stop und Cx43 (Maass et al., 2007) sollten durch Immunfluoreszenz- und Immunoblotanalysen miteinander verglichen werden. Geeignete Bindeproteine für diese Interaktionsanalysen sind unter anderem N-Cadherin, ZO-1, alpha-Catenin und Plakophilin 2 (Maass et al., 2007).

Der Nachweis wachstumshemmender Eigenschaften des C-Terminus von Cx43 (Dang et al., 2003) legt nahe, eventuelle Unterschiede in der Proliferations- und Wachstumsgeschwindigkeit zwischen Cx43D378stop und Cx43WT exprimierenden Zellen zu messen. Die Rolle der ZO-1 Interaktion ist in diesem Zusammenhang noch nicht untersucht worden.

In Erwägung zu ziehen sind ferner Experimente, in denen die Aktivität der Cx43D378stop-Halbkanäle (Dobrowolski et al., 2006) und die Permeabilität der Cx43D378stop-Kanäle für cAMP (Bedner et al., 2003) gemessen werden, um so veränderte Kanaleigenschaften näher charakterisieren zu können.

Ein möglicher Einfluss der Src-Kinase auf die Herunterregulation der Kopplung zwischen Cx43D378stop-HeLa-Zellen ließe sich im Zellsystem leichter untersuchen als an den entsprechenden transgenen Tieren, da Src von HeLa-Zellen exprimiert wird (Kuga et al., 2007). Um die Lokalisation und Bindung von Src und Cx43 im Wildtypzustand und in der mutierten Form zu ermitteln, bieten sich Immunfluoreszenz-, Immunoblot- und Ko-Immunpräzipitationsanalysen an. Die Interaktion zwischen Cx43 und PKA, die die inhibierende Wirkung von Src auf die GJC aufhebt, wurde noch nicht hinreichend erforscht (Pahujaa et al., 2007) (siehe Abschnitt 1.2.3). Denkbar ist, dass die Interaktion zwischen Cx43 und ZO-1 und eine noch unbekannte Signalkaskade zu einer Aktivierung der PKA und damit zur Hemmung der Src-Kinase führen. Mit Hilfe entsprechender Antikörper und Phosphorylierungsstudien oder auch der Verwendung neuer Cx43-Mutationen könnte die Funktion der PKA genauer untersucht werden.

Radioaktiv markiertes Phosphat und Antikörper, die bestimmte phosphorylierte Aminosäurereste erkennen, empfehlen sich für die genaue Erforschung der Rolle der Phospholipase C β 3 und ihres Einflusses auf die Phosphorylierung des Cx43 (Zeijl et al., 2007).

Für Untersuchungen zu Aufklärung einer möglichen Rolle des ZONAB-Proteins sind ebenfalls die oben genannten Methoden geeignet, um eventuelle Unterschiede zwischen Cx43D378stop- und Cx43WT-Zellen aufzuzeigen.

6.4 Ausblicke auf weitere Untersuchungen zum letalen Phänotyp hemizygoter Cx43^{del/fl378stop}: α MHC-Cre- und homozygoter Cx43^{flD378stop/flD378stop}: α MHC-Cre-Tiere

Bei der experimentellen Suche nach der Ursache der frühen Letalität heterozygoter Cx43^{del/fl378stop}: α MHC-Cre und homozygoter Cx43^{flD378stop/flD378stop}: α MHC-Cre Tiere, ist es hilfreich, primäre Kardiomyozytenkulturen dieses Genotyps anzulegen (Dobrowolski et al., 2008). An ihnen sollten dieselben Analysen durchgeführt werden, die für die Cx43D378stop-Zellen vorgestellt wurden (Kopplung zwischen den Zellen, Halbwertszeitbestimmung, Permeabilität für cAMP, veränderte Aktivität von Hemikanälen), da die Ergebnisse den Zuständen *in vivo* näher kommen als die HeLa-Zell Versuche.

Lokalisation, Größe und Zusammensetzung der aus Cx43D378stop bestehenden Gap Junction-Kanäle sollten sowohl mit den Kanälen von Cx43WT als auch von Cx43K258stop verglichen werden (Maass et al., 2007). Dies würde die Abgrenzung der phänotypischen Merkmale, die einerseits durch die ZO-1-Interaktionsdomänen-Ablation und andererseits durch die Ablation des Cx43 C-Terminus verursacht werden, erleichtern.

Morphologische Untersuchungen von ein bzw. zwei Tage alten Tieren werden z. Zt. von Dr. Jung-Sun Kim (Seoul) durchgeführt, die Ergebnisse stehen aber noch aus. Wird bei diesen Experimenten eine divergierende Zellanzahl im Herzen festgestellt, könnte dies auf eine

veränderte ZONAB-Signalkaskade hinweisen. ZONAB wird durch die Bindung an ZO-1 inhibiert (siehe Abschnitt 5.5) (Balda et al., 2003; Tsapara et al., 2006). Wird die Inhibition von ZONAB durch die Bindung zwischen Cx43 und ZO-1 vermittelt, hätte dies möglicherweise Änderungen im Aktivitätsmuster von ZONAB in Cx43D378stop exprimierenden Tieren zur Folge.

Weiterhin sind aus den Ventrikeln Cx43D378stop und Cx43WT exprimierender Tiere Proteinlysate zu gewinnen, um mittels Immunoblot die Menge der tatsächlich exprimierten Proteine miteinander vergleichen zu können. Dadurch könnte, zusammen mit den Kopplungsanalysen der primäre Kardiomyozytenkulturen, überprüft werden, ob die Menge an Cx43D378stop im Herzen ausreicht, um eine geregelte Reizweiterleitung zu ermöglichen. Von großer Bedeutung wären dabei elektrophysiologische Studien am Herzen neugeborener Tiere, da bei Problemen der Reizweiterleitung Tachykardien und Arrhythmien mit Todesfolge auftreten können (Eckardt et al., 2006; Dobrowolski et al., 2008; Kontogeorgis et al., 2008).

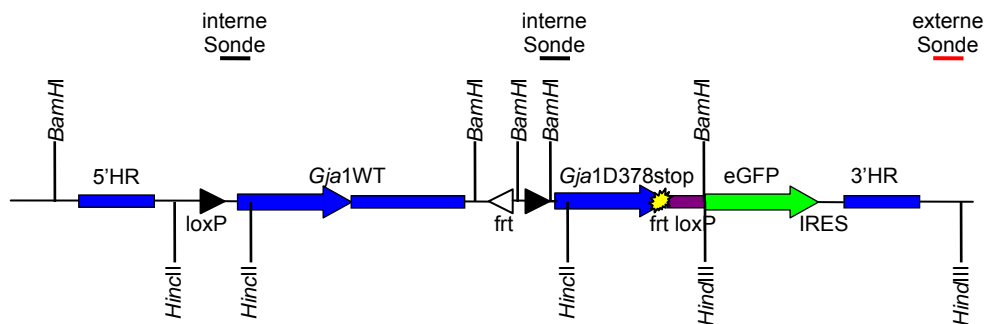
In Herzen der Cx43K258stop-Tiere wurde eine Kopplung von ZO-1 und Cx43K48stop nachgewiesen (Maass et al., 2007). Offen blieb dabei, ob es sich um eine direkte Bindung über eine bisher unbekannte Bindungsstelle oder eine indirekte Bindung handelt, die eventuell über Cx45 vermittelt wird (Laing et al., 2001; Desplantez et al., 2004). Notwendig wäre es daher, zusätzlich zu der von Jiong Zhang etablierten Cx43-ZO-1-Ko-Immunpräzipitation, weitere Ko-Immunpräzipitationsanalysen zwischen Cx43 und Cx45 und zwischen Cx45 und ZO-1 durchzuführen, um die unterschiedlichen Mengen der jeweiligen Interaktionen zu messen und zu vergleichen.

Falls sich die in Cx43D378stop HeLa-Zellen gemessene geringe Kopplung auch in den primären Kardiomyozytenkulturen bestätigt, könnte mit Hilfe der Cx43D378stop exprimierenden Tiere die Rolle der Src-Kinase genauer untersucht werden (siehe Abschnitt 5.5). Dazu sollten vergleichende Immunfluoreszenz-, Immunoblot- und Ko-Immunpräzipitationsanalysen von Cx43D378stop und Src durchgeführt werden, um eventuelle Unterschiede zum Wildtyp aufzuzeigen. Hierzu wäre ein Antikörper zu benutzen, der spezifisch erkennt, ob das Cx43D378stop am Y265 in größeren Mengen phosphoryliert wird als Cx43 in Wildtyp-Tieren (Lin et al., 2006). In diesem Fall könnte eine verstärkte Bindung zwischen Src und Cx43D378stop vorliegen, was die Herunterregulation der GJC erklären würde (siehe Abschnitt 5.5). Ein Ras-Aktivitätsassay könnte weiteren Aufschluss über eine erhöhte Bindung bzw. Aktivität von Src geben. Ras muss aktiv sein, um mit Src einen Komplex zu bilden, der wiederum Src ermöglicht, Cx43 zu phosphorylieren (Pahujaa et al., 2007).

Die hier vorgeschlagenen Experimente sollten erste Hinweise erbringen, warum die im Herzen Cx43D378stop exprimierenden Tiere nach der Geburt versterben.

6.5 Southernblot-Analyse der Cx43D378stop-Tiere

mCx43^{flD378stopΔneo}-Allel:



HincII-Verdau:

(int. Sonde)

814 bp 3335 bp

BamHI-Verdau:

(int. Sonde)

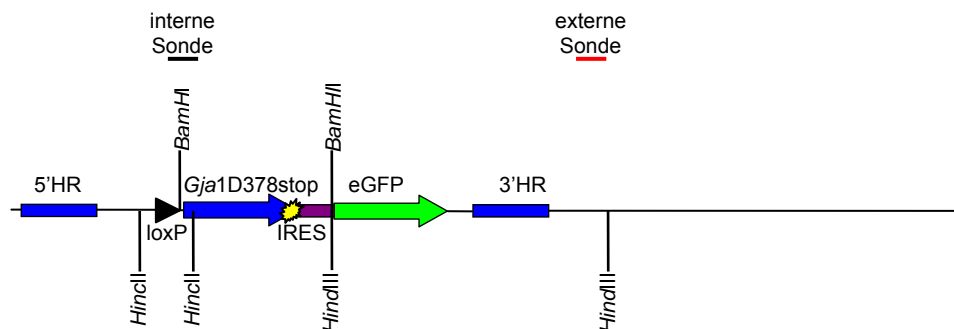
8440 bp 2136 bp

HindIII-Verdau:

(ext. Sonde)

3365 bp

mCx43^{D378stop}-Allel:



HincII-Verdau:

(int. Sonde)

814 bp

BamHI-Verdau:

(int. Sonde)

2136 bp

HindIII-Verdau:

(ext. Sonde)

3365 bp

Abb. 5.1: Schematische Darstellung der Southernblot-Analyse transgener Tiere mit den Genotypen Cx43^{flD378stopΔneo} und Cx43^{D378stop}, die nach einer Verpaarung mit Cre- bzw. eine Flp-Rekombinase tragenden Mäusen geboren werden. Bei beiden Sonden handelt es sich um die unter Abschnitt 4.19 beschriebenen Sonden, sie werden nach Restriktionsspaltungen der genomischen DNS mit den Enzymen *HincII*, *BamHI* und *HindIII* eingesetzt.

Die Southernblot-Analyse der Cx43D378stop transgenen Tiere (Abb. 6.1) soll belegen, dass die homologe Rekombination erfolgreich war (siehe Abschnitte 4.3.5).

Eine zusätzlich durchgeführte Northernblot-Analyse von Gewebeproben, in denen das Cx43D378stop-Protein exprimiert wird, und aus anderen, in denen das Cx43WT-Protein exprimiert wird, sollte die spezifische konditionale Transkription des mutierten Cx43-Konstrukts zeigen. Passend dazu können die jeweils untersuchten Organe unter einem Fluoreszenzmikroskop auf die Expression des eGFP-Reportergens untersucht werden.

6.6 Ausblick auf die Auswirkungen der Cx43D378stop-Expression in anderen Geweben durch die Verpaarung verschiedener Cre-Rekombinase tragender Tiere

Zusätzlich zu den oben beschriebenen Verpaarungen mit transgenen α MHC-Cre Rekombinase-Tieren sollte die Expression des Cx43D378stop-Proteins durch die Kreuzung mit geeigneten Cre-Rekombinase vererbenden Tieren in anderen Geweben untersucht werden. Um die Frage zu beantworten, welche Ausprägung der Phänotyp der Tiere unter der Bedingung, dass im gesamten Tier das Cx43D378stop exprimiert wird, hat, ist eine Verpaarung mit PGK-Cre-Mäusen sinnvoll. Sind die Tiere im heterozygoten Zustand, also $Cx43^{+/flD378stop}:PGK-Cre$ phänotypisch genauso unauffällig wie die $Cx43^{+/flD378stop}:\alpha MHC-Cre$ -Tiere oder ist in diesem Fall die Mutation dominant? Verpaarungen, die von Jiong Zhang angesetzt wurden, um diese Fragestellung zu untersuchen, blieben bisher ohne Nachwuchs. Um zu überprüfen, ob dies bereits ein phänotypischer Befund ist, müssen nun Untersuchungen an embryonalen Tieren folgen.

Die Auswirkungen der Cx43K258stop-Mutation auf Haut und Ovarien wurden bereits beschrieben (Maass et al., 2004). Zumindest in der Haut wurden Veränderungen in der ZO-1-Expression festgestellt. Welche Rolle hier die Interaktion zwischen Cx43 und ZO-1 spielt, muss künftig mit Hilfe von entsprechenden Cre-Rekombinasen ermittelt werden. Für spezifische Untersuchungen der Haut können mehrere transgene Mäuse mit Cre-Rekombinasen unter der Kontrolle verschiedener Keratinpromotoren verwendet werden, z.B. K5 („Keratin 5“)-Cre (Ramirez et al., 2004) oder Keratin 14:Cre (Hafner et al., 2004). Für eine Aktivierung der Expression von Cx43D378stop in der frühen Entwicklung der Gonaden bietet sich die CK19-Cre-(„Cytokine 19“)Mauslinie an (Harada et al., 1999).

Um die Funktion der Interaktion zwischen Cx43 und ZO-1 in Astrozyten zu untersuchen, kämen Verpaarungen mit transgenen Tieren in Betracht, welche die Cre-Rekombinase unter der Kontrolle des hGFAP- (Zhou et al., 2001) oder des Nestin-Promotors (Dubois et al., 2006) exprimieren. Beide Cre-Rekombinase tragende Mauslinien sind zurzeit im Institut für Genetik (Bonn) verfügbar.

Da sich im heterozygoten Zustand sowohl das Cx43K258stop- als auch das Cx43D378stop-Protein nicht dominant gegenüber dem Cx43WT Protein verhalten, wäre es hinsichtlich der Ausprägung des Phänotyps interessant, diese beiden Mauslinien zu verpaaren. Wird der letale Phänotyp der jeweils homozygot exprimierten Proteine verhindert oder kommt es zu

einem völlig anderen Phänotyp? Für die Klärung der Funktion des C-Terminus und der Interaktion zwischen Cx43 und ZO-1 wäre diese Erkenntnis sehr aufschlussreich.

7 Zusammenfassung

Im Rahmen dieser Arbeit wurde eine transgene Mauslinie, welche das mutierte Connexin43 (Cx43D378) konditional exprimieren kann, erzeugt. Mittels des Zielvektors „Cx43D378stopKI“ konnte der Austausch der Cx43 kodierenden Region gegen die Cx43D378stop-Ablationsmutante durch homologe Rekombination erfolgreich in HM1 embryonalen Stammzellen der Maus erreicht werden. Der Vektor enthielt, von zwei loxP-Stellen flankiert, die Gja1WT kodierende DNS, eine Neomycin-Resistenzkassette, die Gja1D378stop kodierende DNS und die eGFP-cDNS, die beide durch eine IRES verbunden sind. Durch die Injektion homolog rekombinierter ES-Zellklone in Blastozysten wurde mit Hilfe von chimären Mäusen, die die Cx43D378stop-Mutation über ihre Keimbahn an ihre Nachkommen vererbten, die transgene Cx43D378stop Mauslinie etabliert.

Durch die Verwendung des konditionalen Vektors war es möglich, das Cx43D378-Protein durch die Verwendung verschiedener gewebespezifischer Cre-Rekombinasen gezielt zu exprimieren und zu untersuchen. Das Reporterprotein eGFP diente dabei der Kontrolle der Expression des Cx43D378stop-Proteins. Da die Gene für beide Proteine auf einer bizistronischen mRNA liegen, die durch eine Interne Ribosomen-Eintrittsstelle verbunden sind, werden sie gemeinsam exprimiert.

Im Gegensatz zu Cx43^{del/K258stop}-Mäusen sind Cx43^{del/flD378stop}: α MHC-Cre-Tiere nicht lebensfähig und sterben innerhalb von 48 Stunden nach der Geburt. Gleiches trifft für homozygote Cx43^{flD378stop flD378stop}: α MHC-Cre-Tiere zu. Die bisherigen Ergebnisse belegen die essentielle Bedeutung der Interaktion zwischen Cx43 und ZO-1 im Mausherzen.

Weiterhin wurden im Rahmen der vorliegenden Arbeit die Expression der Cx43_(Δ 234-243)⁻, der Cx43_(Δ 253-256)⁻ und Cx43D378stop-Ablationsmutanten in HeLa-Zellen erreicht und charakterisiert.

In HeLaCx43_(Δ 234-243)⁻-Zellen, die eine Cx43-Isoform exprimieren, der die Tubulin-Interaktionsdomäne fehlt, wurde im Vergleich zu Cx43WT exprimierenden Zellen eine stark reduzierte Kopplung zwischen den benachbarten Zellen nachgewiesen. Das Vorhandensein einer geringen Restkopplung weist darauf hin, dass es neben der Tubulin-Bindedomäne eine weitere für den Transport des Cx43_(Δ 234-243)⁻-Proteins zuständige Interaktion geben muss. Dieser Transport muss nicht unbedingt Mikrotubulizytosklett abhängig sein.

An Cx43_(Δ 253-256)⁻-HeLa-Zellen, in denen die Interaktion zwischen Cx43 und CIP85 durch die Ablation der Interaktionsdomäne des Cx43 verhindert ist, wurde eine stark eingeschränkte Kopplung im Vergleich zu Cx43WT-Kanälen gefunden. Die erhöhte zytoplasmatische Expression des Cx43_(Δ 253-256)⁻-Proteins und erste Hinweise auf eine verlängerte Halbwertszeit scheinen die Wichtigkeit der CIP85 Bindedomäne beim lysosomalen Abbau des Cx43-Proteins zu bestätigen.

8 Literaturverzeichnis

Abdelmohsen K, Stuhlmann D, Daubrawa F, Klotz LO. (2005). Dicumarol is a potent reversible inhibitor of gap junctional intercellular communication. *Arch Biochem Biophys.* 434(2):241-7.

Adachi M, Inoko A, Hata M, Furuse K, Umeda K, Itoh M, Tsukita S. (2006). Normal establishment of epithelial tight junctions in mice and cultured cells lacking expression of ZO-3, a tight-junction MAGUK protein. *Mol Cell Biol.* 26(23):9003-15.

Agah R, Frenkel PA, French BA, Michael LH, Overbeek PA, Schneider MD. (1997). Gene recombination in postmitotic cells. Targeted expression of Cre recombinase provokes cardiac-restricted, site-specific rearrangement in adult ventricular muscle in vivo. *J Clin Invest.* 100(1):169-79.

Ai Z, Fischer A, Spray DC, Brown AM, Fishman GI. (2000). Wnt-1 regulation of connexin43 in cardiac myocytes. *J.Clin.Invest* 105, 161-171.

Akiyama M, Ishida N, Ogawa T, Yogo K, Takeya T. (2005). Molecular cloning and functional analysis of a novel Cx43 partner protein CIP150. *Biochem Biophys Res Commun.* 335(4):1264-71.

Akoyev V, Takemoto DJ. (2007). ZO-1 is required for Protein kinase C gamma-driven disassembly of connexin 43. *Cell Signal.* 19(5):958-67.

Alves LA, Campos de Carvalho AC, Cirne Lima EO, Rocha e Souza CM, Dardenne M, Spray DC, Savino W. (1995). Functional gap junctions in thymic epithelial cells are formed by connexin 43. *Eur.J.Immunol.* 25, 431-437.

Anderson JM, Stevenson BR, Jesaitis LA, Goddenough DA, Mooseker MS. (1988). Characterization of ZO-1, a protein component of the tight junction from mouse liver and Madin-Darby canine kidney cells. *J Cell Biol.* 106(4):1141-9.

Angst BD, Khan LU, Severs NJ, Whitely K, Rothery S, Thompson RP, Magee AI, Gourdie RG. (1997). Dissociated spatial patterning of gap junctions and cell adhesion junctions during postnatal differentiation of ventricular myocardium. *Circ.Res.* 80, 88-94.

Attal J, Théron MC, Houdebine LM. (1999). The optimal use of IRES (internal ribosome entry site) in expression vectors. *Genet Anal.* 15(3-5):161-5.

Axelsen LN, Stahlhut M, Mohammed S, Larsen BD, Nielsen MS, Holstein-Rathlou NH, Andersen S, Jensen ON, Hennan JK, Kjølbye AL. Identification of ischemia-regulated phosphorylation sites in connexin43: A possible target for the antiarrhythmic peptide analogue rotigaptide (ZP123). *J Mol Cell Cardiol.* 40(6):790-8.

Bajenaru ML, Zhu Y, Hedrick NM, Donahoe J, Parada LF, Gutmann DH. (2002). Astrocyte-specific inactivation of the neurofibromatosis 1 gene (NF1) is insufficient for astrocytoma formation. *Mol Cell Biol* 22:5100-5113.

Balda MS, Matter K. (2000). The tight junction protein ZO-1 and an interacting transcription factor regulate ErbB-2 expression. *EMBO J.* 19(9):2024-33.

Balda MS, Garrett MD, Matter K. (2003). The ZO-1-associated Y-box factor ZONAB regulates epithelial cell proliferation and cell density. *J Cell Biol.* 160(3):423-32.

- Bao X, Reuss L, Altenberg GA. (2004a). Regulation of purified and reconstituted connexin 43 hemichannels by Protein kinase C-mediated phosphorylation of Serine 368. *J Biol Chem.* 279(19):20058-66.
- Bao X, Altenberg GA, Reuss L. (2004b). Mechanism of regulation of the gap junction protein connexin 43 by Protein kinase C-mediated phosphorylation. *Am J Physiol Cell Physiol.* 286(3):C647-54.
- Bao X, Lee SC, Reuss L, Altenberg GA. (2007) Change in permeant size selectivity by phosphorylation of connexin 43 gap-junctional hemichannels by PKC. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 104(12):4919-24.
- Barker RJ, Price RL, Gourdie RG. (2002). Increased association of ZO-1 with connexin43 during remodeling of cardiac gap junctions. *Circ Res.* 90(3):317-24.
- Barresi V, Condorelli DF, Giuffrida Stella AM. (1999). GFAP gene methylation in different neural cell types from rat brain. *Int J Dev Neurosci* 17:821-828.
- Bauer R, Löer B, Ostrowski K, Martini J, Weimbs A, Lechner H and Hoch M. (2005). Intercellular communication: the *Drosophila* innexin multiprotein family of gap junction proteins. *Chem Biol.* 12(5):515-26.
- Bedner P, Niessen H, Odermatt B, Willecke K, Harz H. (2003). A method to determine the relative cAMP permeability of connexin channels. *Exp. Cell Res.* 291, 25-35.
- Bedner P, Niessen H, Odermatt B, Kretz M, Willecke K, Harz H. (2006). Selective permeability of different connexin channels to the second messenger cyclic AMP. *J Biol Chem.* 281:6673-81.
- Bennett MV, Verselis VK. (1992). Biophysics of gap junctions. *Semin Cell Biol.* 1992; 3(1):29-47.
- Beyer EC, Paul DL, Goodenough DA. (1987). Connexin43: a protein from rat heart homologous to a gap junction protein from liver. *J. Cell Biol.* 105, 2621-2629.
- Boengler K, Dodoni G, Rodriguez-Sinovas A, Cabestrero A, Ruiz-Meana M, Gres P, Konietzka I, Lopez-Iglesias C, Garcia-Dorado D, Di Lisa F, Heusch G, Schulz R. (2005). Connexin 43 in cardiomyocyte mitochondria and its increase by ischemic preconditioning. *Cardiovasc Res.* 67(2):234-44.
- Bullock WO, Fernandez JM, Short JM (1987). XL1-Blue: A high efficiency plasmid transforming recA *Escherichia coli* strain with beta-galactosidase selection. *Biotechniques* 5: 376-380.
- Butkevich E, Hülsmann S, Wenzel D, Shirao T, Duden R, Majoul I. (2004). Drebrin is a novel connexin-43 binding partner that links gap junctions to the submembrane cytoskeleton. *Curr Biol.* 14(8):650-8.
- Bradley A, Zheng B, Liu P. (1998). Thirteen years of manipulating the mouse genome: a personal history. *Int J Dev Biol.* 42:943-50.
- Brigstock DR. (1999). The connective tissue growth factor/cysteine-rich 61/nephroblastoma overexpressed (CCN) family. *Endocr. Rev.* 20, 189-206.

- Britz-Cunningham SH, Shah MM, Zuppan CW, Fletcher WH. (1995). Mutations of the Connexin43 gap-junction gene in patients with heart malformations and defects of laterality. *N Engl J Med.* 332(20):1323-9.
- Bruce AF, Rothery S, Dupont E, Severs NJ. (2008). Gap junction remodelling in human heart failure is associated with increased interaction of connexin43 with ZO-1. *Cardiovasc Res.* 77(4):757-65.
- Buchholz F, Angrand PO, Stewart AF. (1998) Improved properties of FLP recombinase evolved by cycling mutagenesis. *Nat Biotechnol* 16:657-662.
- Calero G, Kanemitsu M, Taffet SM, Lau AF, Delmar M. (1998). A 17mer peptide interferes with acidification-induced uncoupling of connexin43. *Circ.Res.* 82, 929-935.
- Casper KB, McCarthy KD. (2006). GFAP-positive progenitor cells produce neurons and oligodendrocytes throughout the CNS. *Mol Cell Neurosci* 31:676-684.
- Chalfie M, Tu Y, Euskirchen G, Ward WW, Prasher DC. (1994). Green fluorescent protein as a marker for gene expression. *Science.* 263:802-5.
- Chankova SG, Dimova E, Dimitrova M, Bryant PE. (2007). Induction of DNA double-strand breaks by zeocin in *Chlamydomonas reinhardtii* and the role of increased DNA double-strand breaks rejoining in the formation of an adaptive response. *Radiat Environ Biophys.* 46(4):409-16.
- Chen J, Pan L, Wei Z, Zhao Y, Zhang M. (2008). Domain-swapped dimerization of ZO-1 PDZ2 generates specific and regulatory connexin43-binding sites. *EMBO J.* 27(15):2113-23.
- Chen JW, Pan W, D'Souza MP, August JT. (1985). Lysosome-associated membrane proteins: characterization of LAMP-1 of macrophage P388 and mouse embryo 3T3 cultured cells. *Arch Biochem Biophys.* 1985 239(2):574-86.
- Chen X, Kojima S, Borisy GG, Green KJ. (2003). p120 catenin associates with kinesin and facilitates the transport of cadherin-catenin complexes to intercellular junctions. *J.Cell Biol.* 163, 547-557.
- Clauss SB, Walker DL, Kirby ML, Schimel D, Lo CW. (2006). Patterning of coronary arteries in wildtype and connexin43 knockout mice. *Dev Dyn.* 235(10):2786-94.
- Coppen SR, Kodama I, Boyett MR, Dobrzynski H, Takagishi Y, Honjo H, Yeh HI, Severs, N.J. (1999). Connexin45, a major connexin of the rabbit sinoatrial node, is co-expressed with connexin43 in a restricted zone at the nodal-crista terminalis border. *J.Histochem.Cytochem.* 47, 907-918.
- Dahl E, Winterhager E, Traub O, Willecke K. (1995). Expression of gap junction genes, connexin40 and connexin43, during fetal mouse development. *Anat.Embryol.(Berl)* 191, 267-278.
- Dahl E, Winterhager E, Reuss B, Traub O, Butterweck A, Willecke K. (1996b). Expression of the gap junction proteins connexin31 and connexin43 correlates with communication compartments in extraembryonic tissues and in the gastrulating mouse embryo, respectively. *J.Cell Sci.* 109, 191-197.
- Dai P, Nakagami T, Tanaka H, Hitomi T, Takamatsu T. (2007). Cx43 mediates TGF-beta signaling through competitive Smads binding to microtubules. *Mol Biol Cell.* 18(6):2264-73.

- Dang,X., Doble,B.W., Kardami,E. (2003). The carboxy-tail of connexin-43 localizes to the nucleus and inhibits cell growth. *Mol.Cell Biochem.* 242, 35-38.
- Darrow BJ, Laing JG, Lampe PD, Saffitz JE, Beyer EC. (1995). Expression of multiple connexins in cultured neonatal rat ventricular myocytes. *Circ Res.* 76(3):381-7.
- Delmar M, Coombs W, Sorgen P, Duffy HS, Taffet SM. (2004). Structural bases for the chemical regulation of Connexin43 channels. *Cardiovasc.Res.* 62, 268-275.
- Delorme B, Dahl E, Jarry-Guichard T, Briand JP, Willecke K, Gros D, Theveniau-Ruissy M. (1997). Expression pattern of connexin gene products at the early developmental stages of the mouse cardiovascular system. *Circ.Res.* 81, 423-437.
- Desplantez T, Halliday D, Dupont E, Weingart R. (2004). Cardiac connexins Cx43 and Cx45: formation of diverse gap junction channels with diverse electrical properties. *Pflugers Arch.* 448(4):363-75.
- Doble BW, Ping P, Kardami E. (2000). The epsilon subtype of Proteinkinase C is required for cardiomyocyte connexin-43 phosphorylation. *Circ Res.* 86(3):293-301.
- Doble BW, Dang X, Ping P, Fandrich RR, Nickel BE, Jin Y, Cattini PA, Kardami E. (2004). Phosphorylation of serine 262 in the gap junction protein connexin-43 regulates DNA synthesis in cell-cell contact forming cardiomyocytes. *J Cell Sci.* 117(Pt 3):507-14.
- Dobrowolski R. (2004). Expression einer Connexin 43 Mutation, die im Menschen Oculodentodigitale Dysplasie verursacht, in HeLa-Zellen und embryonalen Stammzellen der Maus. Diplomarbeit an der Rheinischen-Friedrich-Wilhelms Universität.
- Dobrowolski R, Sommershof A, Willecke K. (2006). Some oculodentodigital dysplasia-associated Cx43 mutations cause increased hemichannel activity in addition to deficient gap junction channels. *J Membr Biol.* 219:9-17.
- Dobrowolski R, Sasse P, Schrickel JW, Watkins M, Kim JS, Rackauskas M, Troatz C, Ghanem A, Tiemann K, Degen J, Bukauskas FF, Civitelli R, Lewalter T, Fleischmann BK, Willecke K. (2008). The conditional connexin43G138R mouse mutant represents a new model of hereditary oculodentodigital dysplasia in humans. *Hum Mol Genet.* 17(4):539-54.
- Dubina MV, Iatckii NA, Popov DE, Vasil'ev SV, Krutovskikh VA. (2002). Connexin 43, but not connexin 32, is mutated at advanced stages of human sporadic colon cancer. *Oncogene* 21, 4992-4996.
- Dubois NC, Hofmann D, Kaloulis K, Bishop JM, Trumpf A. (2006). Nestin-Cre transgenic mouse line Nes-Cre1 mediates highly efficient Cre/loxP mediated recombination in the nervous system, kidney, and somite-derived tissues. *Genesis.* 44(8):355-60.
- Duhl DM, Vrieling H, Miller KA, Wolff GL, Barsh GS. (1994). Neomorphic agouti mutations in obese yellow mice. *Nat.Genet.* 8, 59-65.
- Duffy HS, Delmar M, Coombs W, Taffet SM, Hertzberg EL, Spray DC. (2001). Functional demonstration of connexin-protein binding using surface plasmon resonance. *Cell Commun.Adhes.* 8, 225-229.
- Duffy HS, Sorgen PL, Girvin ME, O'Donnell P, Coombs W, Taffet SM, Delmar M, Spray DC. (2002). pH-dependent intramolecular binding and structure involving Cx43 cytoplasmic domains. *J.Biol.Chem.* 277, 36706-36714.

- Duffy HS, Ashton AW, O'Donnell P, Coombs W, Taffet SM, Delmar M, Spray DC. (2004). Regulation of connexin43 protein complexes by intracellular acidification. *Circ.Res.* 94, 215-222.
- Duncan JC, Fletcher WH. (2002). α 1 Connexin (connexin43) gap junctions and activities of cAMP-dependent Protein kinase and Protein kinase C in developing mouse heart. *Dev.Dyn.* 223, 96-107.
- Dupont E, Matsushita T, Kaba RA, Vozzi C, Coppen SR, Khan N, Kaprielian R, Yacoub MH, Severs NJ. (2001). Altered connexin expression in human congestive heart failure. *J.Mol.Cell Cardiol.* 33, 359-371.
- Eckardt D, Theis M, Degen J, Ott T, van Rijen HV, Kirchhoff S, Kim JS, de Bakker JM, Willecke K. (2004). Functional role of connexin43 gap junction channels in adult mouse heart assessed by inducible gene deletion. *J.Mol.Cell Cardiol.* 36, 101-110.
- Eckardt D, Kirchhoff S, Kim JS, Degen J, Theis M, Ott T, Wiesmann F, Doevendans PA, Lamers WH, de Bakker JM, van Rijen HV, Schneider MD, Willecke K. (2006). Cardiomyocyte-restricted deletion of connexin43 during mouse development. *J Mol Cell Cardiol.* 41(6):963-71.
- Ek-Vitorin JF, Calero G, Morley GE, Coombs W, Taffet SM, Delmar M. (1996). pH regulation of connexin43: molecular analysis of the gating particle. *Biophys.J.* 71, 1273-1284.
- Elfgang C, Eckert R, Lichtenberg-Fraté H, Butterweck A, Traub O, Kléber AG, Hülser DF, und Willecke K. (1995). Specific permeability and selective formation of gap junction channels in connexin-transfected HeLa cells. *J Cell Biol* 129:805-817.
- Emdad L, Uzzaman M, Takagishi Y, Honjo H, Uchida T, Severs NJ, Kodama I, Murata Y. (2001). Gap junction remodeling in hypertrophied left ventricles of aortic-banded rats: prevention by angiotensin II type 1 receptor blockade. *J.Mol.Cell Cardiol.* 33, 219-231.
- Ewart JL, Cohen MF, Meyer RA., Huang GY, Wessels A, Gourdie RG, Chin AJ, Park SM, Lazatin BO, Villabon S, Lo CW. (1997). Heart and neural tube defects in transgenic mice overexpressing the Cx43 gap junction gene. *Development* 124, 1281-1292.
- Fanning AS, Ma TY, Anderson JM. (2002). Isolation and functional characterization of the actin binding region in the tight junction protein ZO-1. *FASEB J.* 16(13):1835-7.
- Fanning AS, Little BP, Rahner C, Utepbergenov D, Walther Z, Anderson JM. (2007). The unique-5 and -6 motifs of ZO-1 regulate tight junction strand localization and scaffolding properties. *Mol Biol Cell.* 18(3):721-31.
- Fanning AS, Lye MF, Anderson JM, Lavie A. (2007). Domain swapping within PDZ2 is responsible for dimerization of ZO proteins. *J Biol Chem.* 282(52):37710-6.
- Flores CE, Li X, Bennett MV, Nagy JI, Pereda AE. (2008). Interaction between connexin35 and zonula occludens-1 and its potential role in the regulation of electrical synapses. *Proc Natl Acad Sci U S A.* [Epub ahead of print]
- Francis D, Stergiopoulos K, Ek-Vitorin JF, Cao FL, Taffet SM, Delmar M. (1999). Connexin diversity and gap junction regulation by pHi. *Dev.Genet.* 24, 123-136.
- Fraser MM, Zhu X, Kwon CH, Uhlmann EJ, Gutmann DH, Baker SJ. (2004). Pten loss causes hypertrophy and increased proliferation of astrocytes in vivo. *Cancer Res* 64:7773-7779.

- Fromaget C, el Aoumari A, Gros D. (1992). Distribution pattern of connexin 43, a gap junctional protein, during the differentiation of mouse heart myocytes. *Differentiation*. 51(1):9-20.
- Fu CT, Bechberger JF, Ozog MA, Perbal B, Naus CC. (2004). CCN3 (NOV) interacts with connexin43 in C6 glioma cells: possible mechanism of connexin-mediated growth suppression. *J Biol Chem*. 279(35):36943-50.
- Fujimoto K, Nagafuchi A, Tsukita S, Kuraoka A, Ohokuma A, Shibata Y. (1997). Dynamics of connexins, E-cadherin and alpha-catenin on cell membranes during gap junction formation. *J.Cell Sci*. 110, 311-322.
- Gaietta G, Deerinck TJ, Adams SR, Bouwer J, Tour O, Laird DW, Sosinsky GE, Tsien RY, Ellisman MH. (2002). Multicolor and electron microscopic imaging of connexin trafficking. *Science*. 296:503-7.
- Ganat YM, Silbereis J, Cave C, Ngu H, Anderson GM, Ohkubo Y, Ment LR, Vaccarino FM. (2006). Early postnatal astroglial cells produce multilineage precursors and neural stem cells in vivo. *J Neurosci* 26:8609-8621.
- Gao Y, Spray DC. (1998). Structural changes in lenses of mice lacking the gap junction protein connexin43. *Invest Ophthalmol.Vis.Sci*. 39, 1198-1209.
- Gellhaus A, Dong X, Propson S, Maass K, Klein-Hitpass L, Kibschull M, Traub O, Willecke K, Perbal B, Lye SJ, Winterhager E. (2004). Connexin43 interacts with NOV: A possible mechanism for negative regulation of cell growth in choriocarcinoma cells. *J.Biol.Chem*. 279(35):36931-42.
- Giepmans B.N., Moolenaar,W.H. (1998). The gap junction protein connexin43 interacts with the second PDZ domain of the zona occludens-1 protein. *Curr.Biol*. 8, 931-934.
- Giepmans BN, Verlaan I, Hengeveld T, Janssen H, Calafat J, Falk MM, Moolenaar WH (2001a). Gap junction protein connexin-43 interacts directly with microtubules. *Curr.Biol*. 11, 1364-1368.
- Giepmans BN, Feiken E, Gebbink MF, Moolenaar WH. (2003). Association of connexin43 with a receptor protein tyrosine phosphatase. *Cell Commun.Adhes*. 10, 201-205.
- Giepmans BN. (2006). Role of connexin43-interacting proteins at gap junctions. *Adv Cardiol*. 42:41-56.
- Girao H, Pereira P. (2007). The proteasome regulates the interaction between Cx43 and ZO-1. *J Cell Biochem*. 102(3):719-28
- Gittens JE, Mhawi AA, Lidington D, Ouellette Y, Kidder GM. (2003). Functional analysis of gap junctions in ovarian granulosa cells: distinct role for connexin43 in early stages of folliculogenesis. *Am.J.Physiol Cell Physiol* 284, C880-C887.
- Goldberg GS, Valiunas V, Brink PR. (2004). Selective permeability of gap junction channels. *Biochim Biophys Acta*.1662:96-101.
- Gourdie RG, Severs NJ, Green CR, Rothery S, Germroth P, Thompson RP. (1993). The spatial distribution and relative abundance of gap-junctional connexin40 and connexin43 correlate to functional properties of components of the cardiac atrioventricular conduction system. *J Cell Sci*. 105 (Pt 4):985-91.

- Gourdie RG, Ghatnekar GS, O'Quinn M, Rhett MJ, Barker RJ, Zhu C, Jourdan J, Hunter AW. (2006). The unstoppable connexin43 carboxyl-terminus: new roles in gap junction organization and wound healing. *Ann N Y Acad Sci.* 1080:49-62.
- Gros D, Dupays L, Alcolea S, Meysen S, Miquerol L, Theveniau-Ruissy M. (2004). Genetically modified mice: tools to decode the functions of connexins in the heart-new models for cardiovascular research. *Cardiovasc.Res.* 62, 299-308.
- Gumbiner B, Lowenkopf T, Apatira D. (1991). Identification of a 160-kDa polypeptide that binds to the tight junction protein ZO-1. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 88(8):3460-4.
- Gupta N, Wang H, McLeod TL, Naus CC, Kyurkchiev S, Advani S, Yu J, Perbal B, Weichselbaum RR. (2001). Inhibition of glioma cell growth and tumorigenic potential by CCN3 (NOV). *Mol.Pathol.* 54, 293-299.
- Gutstein DE, Morley GE, Tamaddon H, Vaidya D, Schneider MD, Chen J, Chien KR, Stuhlmann H, Fishman GI. (2001). Conduction slowing and sudden arrhythmic death in mice with cardiac-restricted inactivation of connexin43. *Circ.Res.* 88, 333-339.
- Haefliger JA, Nicod P, Meda P. (2004). Contribution of connexins to the function of the vascular wall. *Cardiovasc.Res.* 62 , 345-356.
- Hafner M, Wenk J, Nenci A, Pasparakis M, Scharffetter-Kochanek K, Smyth N, Peters T, Kess D, Holtkötter O, Shephard P, Kudlow JE, Smola H, Haase I, Schippers A, Krieg T, Müller W. (2004). Keratin 14 Cre transgenic mice authenticate keratin 14 as an oocyte-expressed protein. *Genesis.* 38(4):176-81.
- Hammond C, Helenius A. (1994). Quality control in the secretory pathway: retention of a misfolded viral membrane glycoprotein involves cycling between the ER, intermediate compartment, and Golgi apparatus. *J Cell Biol* 126: 41-52.
- Han B, Zhang JT. (2002). Regulation of gene expression by internal ribosome entry sites or cryptic promoters: the eIF4G story. *Mol Cell Biol.* 22:7372-84.
- Hanahan D. (1983). Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J Mol Biol.* 166: 557-80.
- Harada N, Tamai Y, Ishikawa T, Sauer B, Takaku K, Oshima M and Taketo MM. (1999). Intestinal polyposis in mice with a dominant stable mutation of the beta-catenin gene. *EMBO J.* 18,5931 -5942.
- Haskins J, Gu L, Wittchen ES, Hibbard J, Stevenson BR. (1998). ZO-3, a novel member of the MAGUK protein family found at the tight junction, interacts with ZO-1 and occludin. *J Cell Biol.* 141(1):199-208.
- Hertlein B, Butterweck A, Haubrich S, Willecke K, Traub O. (1998). Phosphorylated carboxy terminal serine residues stabilize the mouse gap junction protein connexin45 against degradation. *J. Membr. Biol.* 162, 247-257.
- Herve JC, Bourmeyster N, Sarrouilhe D. (2004). Diversity in protein-protein interactions of connexins: emerging roles. *Biochim Biophys Acta*;1662(1-2):22-41.
- Hilton DJ, Nicola NA, Metcalf D. (1991). Distribution and comparison of receptors for leukemia inhibitory factor on murine hemopoietic and hepatic cells. *J.Cell Physiol* 146, 207-215.

- Hirrlinger PG, Scheller A, Braun C, Hirrlinger J, Kirchhoff F. (2006). Temporal control of gene recombination in astrocytes by transgenic expression of the tamoxifen-inducible DNA recombinase variant CreERT2. *Glia* 54:11-20.
- Hirst-Jensen BJ, Sahoo P, Kieken F, Delmar M, Sorgen PL. (2006). Characterization of the pH-dependent interaction between the gap junction protein connexin43 carboxyl terminus and cytoplasmic loop domains. *J Biol Chem.* 282(8):5801-13.
- Hombach S., Janssen-Bienhold,U., Söhl,G., Schubert,T., Büssow,H., Ott,T., Weiler,R., Willecke,K. (2004). Functional expression of connexin57 in horizontal cells of the mouse retina. *Eur.J.Neurosci.* 19, 2633-2640.
- Homma N, Alvarado JL, Coombs W, Stergiopoulos K, Taffet SM, Lau AF, Delmar M. (1998). A particle-receptor model for the insulin-induced closure of connexin43 channels. *Circ.Res.* 83, 27-32.
- Honda K, Sakaguchi T, Sakai K, Schmedt C, Ramirez A, Jorcano JL, Tarakhovsky A, Kamisoyama H, Sakai T. (2007). Epidermal hyperplasia and papillomatosis in mice with a keratinocyte-restricted deletion of csk. *Carcinogenesis.* 28(10):2074-81.
- Huang GY, Cooper ES, Waldo K, Kirby ML, Gilula NB, Lo CW. (1998). Gap junction-mediated cell-cell communication modulates mouse neural crest migration. *J.Cell Biol.* 143, 1725-1734.
- Hunter AW, Gourdie RG. (2008). The second PDZ domain of zonula occludens-1 is dispensable for targeting to connexin 43 gap junctions. *Cell Commun Adhes.* 15(1):55-63.
- Hunter AW, Barker RJ, Zhu C, Gourdie RG. (2005). Zonula occludens-1 alters connexin43 gap junction size and organization by influencing channel accretion. *Mol Biol Cell.*16(12):5686-98.
- Hwang J, Kim YY, Huh S, Shim J, Park C, Kimm K, Choi DK, Park TK, Kim S. (2005). The time-dependent serial gene response to Zeocin treatment involves caspase-dependent apoptosis in HeLa cells. *Microbiol Immunol.* (4):331-42.
- Ikenouchi J, Umeda K, Tsukita S, Furuse M, Tsukita S. (2007). Requirement of ZO-1 for the formation of belt-like adherens junctions during epithelial cell polarization. *J Cell Biol.* 176(6):779-86.
- Itoh M, Nagafuchi A, Yonemura S, Kitani-Yasuda T, Tsukita S, Tsukita S. (1993). The 220-kD protein colocalizing with cadherins in non-epithelial cells is identical to ZO-1, a tight junction-associated protein in epithelial cells: cDNA cloning and immunoelectron microscopy. *J Cell Biol.* 121(3):491-502.
- Itoh M, Nagafuchi A, Moroi S, Tsukita S. (1997). Involvement of ZO-1 in cadherin-based cell adhesion through its direct binding to alpha catenin and actin filaments. *J Cell Biol.* 14;138(1):181-92.
- Jäckle S, Beisiegel U, Rinninger F, Buck F, Grigoleit A, Block A, Gröger I, Greten H, Windler E. (1994). Annexin VI, a marker protein of hepatocytic endosomes. *J Biol Chem.* 269(2):1026-32.
- Jackson IJ. (1997). Homologous pigmentation mutations in human, mouse and other model organisms. *Hum.Mol.Genet.* 6, 1613-1624.

- Jones HW Jr, McKusick VA, Harper PS, Wu KD. (1971). George Otto Grey. (1899-1970). The HeLa cell and a reappraisal of its origin. *Obstet Gynecol.* 38: 945-49.
- Jordan K, Chodock R, Hand AR, Laird DW. (2001). The origin of annular junctions: a mechanism of gap junction internalization. *J Cell Sci.* 114: 763-73.
- Kandel E.R., Schwartz, J.H., Jessell, T.M. (1995) Principles of neural science. Appleton & Lange, Third edition.
- Kanemitsu MY, Jiang W, Eckhart W. (1998). Cdc2-mediated phosphorylation of the gap junction protein, connexin43, during mitosis, *Cell Growth Differ.* 9 13–21.
- Katsuno T, Umeda K, Matsui T, Hata M, Tamura A, Itoh M, Takeuchi K, Fujimori T, Nabeshima YI, Noda T, Tsukita S, Tsukita S. (2008). Deficiency of Zonula Occludens-1 Causes Embryonic Lethal Phenotype Associated with Defected Yolk Sac Angiogenesis and Apoptosis of Embryonic Cells. *Mol Biol Cell.* 19(6):2465-2475.
- Kim DY, Kam Y, Koo SK, Joe CO. (1999). Gating connexin 43 channels reconstituted in lipid vesicles by mitogen-activated Protein kinase phosphorylation. *J. Biol. Chem.* 274, 5581-5587
- Kirchhoff S, Kim JS, Hagendorff A, Thönnissen E, Krüger O, Lamers WH, Willecke K. (2000). Abnormal cardiac conduction and morphogenesis in connexin40 and connexin43 double-deficient mice. *Circ. Res.* 87, 399-405.
- Kojima T, Kokai Y, Chiba H, Yamamoto M, Mochizuki Y, Sawada N. (2001). Cx32 but not Cx26 is associated with tight junctions in primary cultures of rat hepatocytes. *Exp Cell Res.* 263(2):193-201.
- Kontogeorgis A, Li X, Kang EY, Feig JE, Ponzio M, Kang G, Kaba RA, Wit AL, Fisher E, Morley GE, Peters NS, Coetzee WA, Gutstein DE. (2008). Decreased connexin43 expression in the mouse heart potentiates pacing-induced remodeling of repolarizing currents. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* [Epub ahead of print]
- Kostin S, Rieger M, Dammer S, Hein S, Richter M, Klovekorn WP, Bauer EP, Schaper J. (2003). Gap junction remodeling and altered connexin43 expression in the failing human heart. *Mol. Cell Biochem.* 242, 135-144.
- Kostyniuk CL, Dehm SM, Batten D, Bonham K. (2002). The ubiquitous and tissue specific promoters of the human SRC gene are repressed by inhibitors of histone deacetylases. *Oncogene.* 21(41):6340-7.
- Krenacs T, van Dartel M, Lindhout E, Rosendaal M. (1997). Direct cell/cell communication in the lymphoid germinal center: connexin43 gap junctions functionally couple follicular dendritic cells to each other and to B lymphocytes. *Eur. J. Immunol.* 27, 1489-1497.
- Kretz M, Eckardt D, Krüger O, Kim JS, Maurer J, Theis M, van Rijen HV, Schorle H, Willecke K. (2006). Normal embryonic development and cardiac morphogenesis in mice with Wnt1-Cre-mediated deletion of connexin43. *Genesis.* 44(6):269-76.
- Kretz M, Euwens C, Hombach S, Eckardt D, Teubner B, Traub O, Willecke K, Ott T. (2003). Altered connexin expression and wound healing in the epidermis of connexin-deficient mice. *J. Cell Sci.* 116, 3443-3452.
- Kühn R, Schwenk F. (1997). Advances in gene targeting methods. *Curr. Opin. Immunol.* 9:183-188

- Kuga T, Nakayama Y, Hoshino M, Higashiyama Y, Obata Y, Matsuda D, Kasahara K, Fukumoto Y, Yamaguchi N. (2007). Differential mitotic activation of endogenous c-Src, c-Yes, and Lyn in HeLa cells. *Arch Biochem Biophys*. 466(1):116-24.
- Kwak BR, Sáez JC, Wilders R, Chanson M, Fishman GI, Hertzberg EL, Spray DC, Jongsma HJ. (1995). Effects of cGMP-dependent phosphorylation on rat and human connexin43 gap junction channels. *Pflugers Arch*. 430(5):770-8.
- Kwon CH, Zhu X, Zhang J, Knoop LL, Tharp R, Smeyne RJ, Eberhart CG, Burger PC, Baker SJ. (2001). Pten regulates neuronal soma size: a mouse model of Lhermitte-Duclos disease. *Nat Genet* 29:404-411.
- Laemmli UK. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 227:680-685.
- Laing JG, Tadros PN, Green K, Saffitz JE, Beyer EC. (1998). Proteolysis of connexin43-containing gap junctions in normal and heat-stressed cardiac myocytes. *Cardiovasc.Res*. 38, 711-718.
- Laing JG, Manley-Markowski RN, Koval M, Civitelli R, Steinberg TH. (2001). Connexin45 interacts with zonula occludens-1 and connexin43 in osteoblastic cells. *J Biol Chem*. 276(25):23051-5.
- Laird DW. (2006). Life cycle of connexins in health and disease. *Biochem J*. 394:527-43.
- Lallemand Y, Luria V, Haffner-Krausz R, Lonai P. (1998). Maternally expressed PGK-Cre transgene as a tool for early and uniform activation of the Cre site-specific recombinase. *Transgenic Res*. 7(2):105-12.
- Lampe PD, TenBroek EM, Burt JM, Kurata WE, Johnson RG, Lau AF. (2000). Phosphorylation of connexin43 on serine368 by Protein kinase C regulates gap junctional communication. *J.Cell Biol*. 149, 1503-1512.
- Lampe PD, Lau AF. (2004) The effects of connexin phosphorylation on gap junctional communication. *Int J Biochem Cell Biol*. 36(7):1171-86.
- Lan Z, Kurata WE, Martyn KD, Jin C, Lau AF. (2005). Novel rab GAP-like protein, CIP85, interacts with connexin43 and induces its degradation. *Biochemistry*. 44(7):2385-96.
- Landisman CE, Long MA, Beierlein M, Deans MR, Paul DL, Connors BW. (2002). Electrical synapses in the thalamic reticular nucleus. *J Neurosci*. 22:1002-9.
- Lauf U, Giepmans BN, Lopez P, Braconnot S, Chen SC, Falk MM. (2002). Dynamic trafficking and delivery of connexons to the plasma membrane and accretion to gap junctions in living cells. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 99, 10446-10451.
- Langlois S, Cowan KN, Shao Q, Cowan BJ, Laird DW. (2007). Caveolin-1 and -2 interact with connexin43 and regulate gap junctional intercellular communication in keratinocytes. *Mol Biol Cell*. 2008;19(3):912-28.
- Lecanda F, Warlow PM, Sheikh S, Furlan F, Steinberg TH, Civitelli R. (2000). Connexin43 deficiency causes delayed ossification, craniofacial abnormalities, and osteoblast dysfunction. *J.Cell Biol*. 151, 931-944.
- Lee Y, Su M, Messing A, Brenner M. (2006). Astrocyte heterogeneity revealed by expression of a GFAP-LacZ transgene. *Glia* 53:677-687.

- Lewandoski M. (2001) Conditional control of gene expression in the mouse. *Nat. Rev. Genet.* 2:743-755
- Leykauf K, Salek M, Bomke J, Frech M, Lehmann WD, Dürst M, Alonso A. (2006). Ubiquitin protein ligase Nedd4 binds to connexin43 by a phosphorylation-modulated process. *J Cell Sci.* 119(Pt 17):3634-42.
- Li X, Olson C, Lu S, Nagy JI. (2004). Association of connexin36 with zonula occludens-1 in HeLa cells, betaTC-3 cells, pancreas, and adrenal gland. *Histochem Cell Biol.* 122(5):485-98.
- Li X, Ionescu AV, Lynn BD, Lu S, Kamasawa N, Morita M, Davidson KG, Yasumura T, Rash JE, Nagy JI. (2004) Connexin47, connexin29 and connexin32 co-expression in oligodendrocytes and Cx47 association with zonula occludens-1 (ZO-1) in mouse brain. *Neuroscience.* 126(3):611-30.
- Li J, Patel VV, Kostetskii I, Xiong Y, Chu AF, Jacobson JT, Yu C, Morley GE, Molkentin JD, Radice GL. (2005) Cardiac-specific loss of N-cadherin leads to alteration in connexins with conduction slowing and arrhythmogenesis. *Circ Res.* 97(5):474-81.
- Li W, Hertzberg EL, Spray DC. (2005). Regulation of connexin43-protein binding in astrocytes in response to chemical ischemia/hypoxia. *J Biol Chem.* 280(9):7941-8.
- Li X, Su V, Kurata WE, Jin C, Lau AF. (2007). A novel connexin43-interacting protein, CIP75, which belongs to the Ubl-UBA protein family, regulates the turnover of connexin43. *J Biol Chem.* 283(9):5748-59.
- Lin R, Martyn KD, Guyette CV, Lau AF, Warn-Cramer BJ. (2006). v-Src tyrosine phosphorylation of connexin43: regulation of gap junction communication and effects on cell transformation. *Cell Commun Adhes.* 13(4):199-216.
- Liu S, Taffet S, Stoner L, Delmar M, Vallano ML, Jalife J. (1993). A structural basis for the unequal sensitivity of the major cardiac and liver gap junctions to intracellular acidification: the carboxyl tail length. *Biophys. J.* 64, 1422-1433.
- Liu HS, Jan MS, Chou CK, Chen PH, Ke NJ. (1999). Is green fluorescent protein toxic to the living cells? *Biochem Biophys Res Commun.* 260:712-7.
- Lo CW. (2000). Role of gap junctions in cardiac conduction and development: insights from the connexin knockout mice. *Circ. Res.* 87, 346-348.
- Lu SJ, Li H, Zhou FH, Zhang JJ, Wang LX. (2007). Connexin 36 is expressed and associated with zonula occludens-1 protein in PC-12 cells. *Gen Physiol Biophys.* 26(1):33-9.
- Maass K. (2004). Gezielte Erzeugung und Analyse transgener Mäuse zur Aufklärung der Funktion der C-terminalen Domäne des Cx43 Proteins *in vivo*. Dissertation an der Rheinischen-Friedrich-Wilhelms Universität.
- Maass K, Ghanem A, Kim JS, Saathoff M, Urschel S, Kirfel G, Grümmer R, Kretz M, Lewalter T, Tiemann K, Winterhager E, Herzog V, Willecke K. (2004). Defective epidermal barrier in neonatal mice lacking the C-terminal region of connexin43. *Mol Biol Cell.* 15(10):4597-608.

- Maass K, Shibayama J, Chase SE, Willecke K, Delmar M. (2007). C-terminal truncation of connexin43 changes number, size, and localization of cardiac gap Junction-Plaques. *Circ Res.* 101(12):1283-91.
- Magin TM, McWhir J, and Melton DW. (1992). A new mouse embryonic stem cell line with good germ line contribution and gene targeting frequency. *Nucleic Acids Res.* 20, 3795-3796.
- Manjunath CK, Goings GE, Page E. (1984). Cytoplasmic surface and intramembrane components of rat heart gap junctional proteins. *Am.J.Physiol* 246, H865-H875.
- Martin PE, Evans WH. (2004). Incorporation of connexins into plasma membranes and gap junctions. *Cardiovasc Res.* 2004;62(2):378-87.
- Martinez AD, Hayrapetyan V, Moreno AP, Beyer EC. (2003). A carboxyl terminal domain of connexin43 is critical for gap Junction-Plaque formation but not for homo- or hetero-ligomerization. *Cell Commun Adhes.* 10(4-6):323-8.
- Maschke S. (2005). Untersuchung der embryonalen Lethalität von Mäusen in denen Connexin26 anstelle von Connexin45 ausgeprägt wird. Diplomarbeit an der Rheinischen-Friedrich-Wilhelms Universität.
- Matsushita T, Oyamada M, Kurata H, Masuda S, Takahashi A, Emmoto T, Shiraishi I, Wada Y, Oka T, Takamatsu T. (1999). Formation of cell junctions between grafted and host cardiomyocytes at the border zone of rat myocardial infarction. *Circulation* 100, II262-II268.
- McNeil E, Capaldo CT, Macara IG. (2006). Zonula occludens-1 function in the assembly of tight junctions in Madin-Darby canine kidney epithelial cells. *Mol Biol Cell.* 17(4):1922-32.
- Meşe G, Richard G, White TW (2007). Gap junctions: basic structure and function. *J Invest Dermatol.* 127:2516-24.
- Mitchell JA, Lye SJ. (2001). Regulation of connexin43 expression by c-fos and c-jun in myometrial cells. *Cell Commun.Adhes.* 8, 299-302.
- Montecino-Rodriguez E, Leathers H, Dorshkind K. (2000). Expression of connexin 43 (Cx43) is critical for normal hematopoiesis. *Blood* 96, 917-924.
- Moorby CD, Gherardi E. (1999). Expression of a Cx43-Deletion mutant in 3T3 A31 fibroblasts prevents PDGF-induced inhibition of cell communication and suppresses cell growth. *Exp.Cell Res.* 249, 367-376.
- Moreno AP, Chanson M, Elenes S, Anumonwo J, Scerri I, Gu H, Taffet SM, Delmar M. (2002). Role of the carboxyl terminal of connexin43 in transjunctional fast voltage gating. *Circ.Res.* 90, 450-457.
- Morley GE, Taffet SM, Delmar M. (1996). Intramolecular interactions mediate pH regulation of connexin43 channels. *Biophys.J.* 70, 1294-1302.
- Murakami S, Muramatsu T, Shimono M. (2001). Expression and localization of connexin 43 in rat incisor odontoblasts. *Anat.Embryol.(Berl)* 203, 367-374.
- Musil LS, Le AC, VanSlyke JK, Roberts LM. (2000). Regulation of connexin degradation as a mechanism to increase gap junction assembly and function. *J Biol Chem.* 275:25207-15.

- Nagy A. (2000). Cre recombinase: the universal reagent for genome tailoring. *Genesis*. 26:99-109.
- Nagy A, Perrimon N, Sandmeyer S, Plasterk R. (2003). Tailoring the genome: the power of genetic approaches. *Nat Genet*. 33:276-284.
- Nakamura N, Rabouille C, Watson R, Nilsson T, Hui N, Slusarewicz P, Kreis TE, Warren G. (1995). Characterization of a cis-Golgi matrix protein, GM130. *J Cell Biol*. 1995 131(6 Pt 2):1715-26.
- Nambara C, Kawasaki Y, Yamasaki H. (2007). Role of the cytoplasmic loop domain of Cx43 in its intracellular localization and function: possible interaction with cadherin. *J Membr Biol*. 217(1-3):63-9.
- Neijssen J, Herberts C, Drijfhout JW, Reits E, Janssen L, Neefjes J. (2005) Crosspresentation by intercellular peptide transfer through gap junctions. *Nature*. 434:83-8.
- Nielsen PA, Beahm DL, Giepmans BN, Baruch A, Hall JE, Kumar NM. (2002). Molecular cloning, functional expression, and tissue distribution of a novel human gap junction-forming protein, connexin-31.9. Interaction with zona occludens protein-1. *J Biol Chem*. 277(41):38272-83.
- Nielsen PA, Baruch A, Shestopalov VI, Giepmans BN, Dunia I, Benedetti EL, Kumar NM. (2003). Lens connexins alpha3Cx46 and alpha8Cx50 interact with zonula occludens protein-1 (ZO-1). *Mol Biol Cell*. 14(6):2470-81.
- Olbina G, Eckhart W. (2003). Mutations in the second extracellular region of connexin 43 prevent localization to the plasma membrane, but do not affect its ability to suppress cell growth. *Mol Cancer Res*. 1(9):690-700.
- Omori Y, Yamasaki H. (1999). Gap junction proteins connexin32 and connexin43 partially acquire growth-suppressive function in HeLa cells by deletion of their C-terminal tails. *Carcinogenesis*. 20(10):1913-8.
- Osler ME, Chang MS, Bader DM. (2005). Bves modulates epithelial integrity through an interaction at the tight junction. *J Cell Sci*. 15;118(Pt 20):4667-78.
- Oviedo-Orta E, Howard EW. (2004). Gap junctions and connexin-mediated communication in the immune system. *Biochim.Biophys.Acta* 1662, 102-112
- Pahujaa M, Anikin M, Goldberg GS. (2007). Phosphorylation of connexin43 induced by Src: regulation of gap junctional communication between transformed cells. *Exp Cell Res*. 313(20):4083-90
- Panchin YV. (2005) Evolution of gap junction proteins-the pannexin alternative. *J Exp Biol*. 208:1415-9.
- Paulson AF, Lampe PD, Meyer RA, TenBroek E, Atkinson MM, Walseth TF, Johnson, R.G. (2000). Cyclic AMP and LDL trigger a rapid enhancement in gap junction assembly through a stimulation of connexin trafficking. *J.Cell Sci*. 113, 3037-3049.
- Peracchia C. (2004). Chemical gating of gap junction channels; roles of calcium, pH and calmodulin. *Biochim Biophys Acta*.1662:61-80.

- Peters NS, Coromilas J, Severs NJ, Wit AL. (1997). Disturbed connexin43 gap junction distribution correlates with the location of reentrant circuits in the epicardial border zone of healing canine infarcts that cause ventricular tachycardia. *Circulation* 95, 988-996.
- Peters NS, Wit AL. (1998). Myocardial architecture and ventricular arrhythmogenesis. *Circulation* 97, 1746-1754.
- Phelan P. (2005) Innexins: members of an evolutionarily conserved family of gapjunctionproteins. *Biochim Biophys Acta*. 1711:225-45.
- Plum A, Hallas G, Magin T, Dombrowski F, Hagendorff A, Schumacher B, Wolpert C, Kim J, Lamers WH, Evert M, Meda P, Traub O, Willecke K. (2000). Unique and shared functions of different connexins in mice. *Curr.Biol.* 10, 1083-1091.
- Pucéat M, Roche S, Vassort G. (1998). Src family tyrosine kinase regulates intracellular pH in cardiomyocytes. *J Cell Biol.* 141(7):1637-46.
- Ramirez A, Page A, Gandarillas A, Zanet J, Pibre S, Vidal M, Tusell L, Genesca A, Whitaker DA, Melton DW, Jorcano JL. (2004). A keratin K5Cre transgenic line appropriate for tissue-specific or generalized Cre-mediated recombination. *Genesis*. 39(1):52-7.
- Reaume AG, de Sousa PA, Kulkarni S, Langille BL, Zhu D, Davies TC, Juneja SC, Kidder GM, Rossant J. (1995). Cardiac malformation in neonatal mice lacking connexin43. *Science* 267, 1831-1834.
- Requardt RP, Kaczmarczyk L, Dublin P, Wallraff-Beck A, Mikeska T, Degen J, Waha A, Steinhäuser C, Willecke K, Theis M. (2008). Quality control of astrocyte-directed Cre transgenic mice: the benefits of a direct link between loss of gene expression and reporter activation. *Glia*. 2008 Oct 22. [Epub ahead of print].
- Reuss B, Hellmann P, Traub O, Butterweck A, Winterhager E. (1997). Expression of connexin31 and connexin43 genes in early rat embryos. *Dev.Genet.* 21, 82-90.
- Revel JP, Karnovsky MJ. (1967). Hexagonal array of subunits in intercellular junctions of the mouse heart and liver. *J.Cell Biol.* 33, C7-C12.
- Rodríguez CI, Buchholz F, Galloway J, Sequerra R, Kasper J, Ayala R, Stewart AF, and Dymecki SM. (2000). High-efficiency deleter mice show that FLPe is an alternative to Cre-loxP. *Nat. Genet.* 25, 139-140.
- Rodríguez-Sinovas A, Boengler K, Cabestrero A, Gres P, Morente M, Ruiz.Meana M, Konietzka I, Miro E, Totzeck A, Heusch G, Schulz R, Garcia-Dorado D. (2006). Translocation of connexin 43 to the inner mitochondrial membrane of cardiomyocytes through the heat shock protein 90-dependent TOM pathway and its importance for cardioprotection. *Circ Res.*;99(1):93-101.
- Roscoe WA, Barr KJ, Mhawi AA, Pomerantz DK, Kidder GM. (2001). Failure of spermatogenesis in mice lacking connexin43. *Biol.Reprod.* 65, 829-838.
- Ruangvoravat CP, Lo CW. (1992). Connexin 43 expression in the mouse embryo: localization of transcripts within developmentally significant domains. *Dev.Dyn.* 194, 261-281.
- Sachs AB, Sarnow P, Hentze MW. (1997). Starting at the beginning, middle, and end: translation initiation in eukaryotes. *Cell*.89:831-8.

- Saez JC, Berthoud VM, Branes MC, Martinez AD, Beyer EC. (2003) Plasma membrane channels formed by connexins: their regulation and functions. *Physiol Rev.* 83:1359-400.
- Saffitz JE, Laing JG, Yamada KA. (2000). Connexin expression and turnover : implications for cardiac excitability. *Circ Res.*86:723-8.
- Sainio K, Gilbert SF, Lehtonen E, Nishi M, Kumar NM, Gilula NB, Saxen L. (1992). Differential expression of gap junction mRNAs and proteins in the developing murine kidney and in experimentally induced nephric mesenchymes. *Development* 115, 827-837.
- Saito K, Enya K, Oneyama C, Hikita T, Okada M. (2008). Proteomic identification of ZO-1/2 as a novel scaffold for Src/Csk regulatory circuit. *Biochem Biophys Res Commun.* 366(4):969-75.
- Sambrook J, Gething MJ. (1989). Protein structure. Chaperones, paperones. *Nature.* 342(6247):224-5.
- Schlieker C. Reinigung der C-terminalen Domäne des Ratten Connexin43 Proteins nach Expressionsklonierung in Bakterien, Hefen und Insektenzellen. Diplomarbeit. Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn. 2000.
- Schneeberger EE, Lynch RD. (2004). The tight junction: a multifunctional complex. *Am J Physiol Cell Physiol.* 286(6):C1213-28.
- Schulz TJ, Glaubitz M, Kuhlowl D, Thierbach R, Birringer M, Steinberg P, Pfeiffer AF, Ristow M. (2007). Variable expression of cre recombinase transgenes precludes reliable prediction of tissue-specific gene disruption by tail-biopsy genotyping. *PLoS ONE* 2:e1013.
- Segretain D, Decrouy X, Dompierre J, Escalier D, Rahman N, Fiorini C, Mograbi B, Siffroi JP, Huhtaniemi I, Fenichel P, Pointis G. (2003). Sequestration of connexin43 in the early endosomes: an early event of Leydig cell tumor progression. *Mol Carcinog.* 2003;38(4):179-87.
- Segretain D, Fiorini C, Decrouy X, Defamie N, Prat JR, Pointis G. (2004). A proposed role for ZO-1 in targeting connexin 43 gap junctions to the endocytic pathway. *Biochimie.* 86(4-5):241-4.
- Seki A, Coombs W, Taffet SM, Delmar M. (2004). Loss of electrical communication, but not plaque formation, after mutations in the cytoplasmic loop of connexin43. *Heart Rhythm.* 1(2):227-33.
- Severs NJ, Dupont E, Coppen SR, Halliday D, Inett E, Baylis D, Rothery S. (2004). Remodelling of gap junctions and connexin expression in heart disease. *Biochim Biophys Acta.* 1662:138-48.
- Severs NJ. (2007). The carboxy terminal domain of connexin43: from molecular regulation of the gap junction channel to supramolecular organization of the intercalated disk. *Circ Res.* 101(12):1213-5.
- Shashikant CS, Ruddell FH. (2003). Impact of transgenic technologies on functional genomics. *Curr Issues Mol Biol.* 5:75-98.
- Shaw RM, Fay AJ, Puthenveedu MA, von Zastrow M, Jan YN, Jan LY. (2007). Microtubule plus-end-tracking proteins target gap junctions directly from the cell interior to adherens junctions. *Cell.* 128(3):547-60.

- Shen Y, Khusial PR, Li X, Ichikawa H, Moreno AP, Goldberg GS. (2007). SRC utilizes Cas to block gap junctional communication mediated by connexin43. *J Biol Chem.* 282(26):18914-21.
- Shestopalov VI and Panchin Y. (2008) Pannexins and gap junction protein diversity. *Cell Mol Life Sci.* 65:376-94.
- Singh D, Solan JL, Taffet SM, Javier R, Lampe PD. (2005). Connexin 43 interacts with zona occludens-1 and -2 proteins in a cell cycle stage-specific manner. *J Biol Chem.* 280(34):30416-21.
- Slice LW, Yee HF Jr, Walsh JH. (1998). Visualization of internalization and recycling of the gastrin releasing peptide receptor-green fluorescent protein chimera expressed in epithelial cells. *Receptors Channels.*6:201-12.
- Smith GM, Berry RL, Yang J, Tanelian D. (1997). Electrophysiological analysis of dorsal root ganglion neurons pre- and post-coexpression of green fluorescent protein and functional 5-HT3 receptor. *J Neurophysiol.* 77:3115-21.
- Sourisseau T, Georgiadis A, Tsapara A, Ali RR, Pestell R, Matter K, Balda MS. (2006). Regulation of PCNA and cyclin D1 expression and epithelial morphogenesis by the ZO-1-regulated transcription factor ZONAB/DbpA. *Mol Cell Biol.* 26(6):2387-98.
- Sternberg N, Sauer B, Hoess R, Abremski K. (1986). Bacteriophage P1 cre gene and its regulatory region. Evidence for multiple promoters and for regulation by DNA methylation. *J Mol Biol.* 187(2):197-212.
- Solan JL, Lampe PD. (2005). Connexin phosphorylation as a regulatory event linked to gap junction channel assembly. *Biochim Biophys Acta.* 1711(2):154-63.
- Solan JL, Lampe PD. (2007). Key connexin 43 phosphorylation events regulate the gap junction life cycle. *J Membr Biol.* 217(1-3):35-41.
- Sorgen PL, Duffy HS, Sahoo P, Coombs W, Delmar M, Spray DC. (2004). Structural changes in the carboxyl terminus of the gap junction protein connexin43 indicates signaling between binding domains for c-Src and zonula occludens-1. *J Biol Chem.* 279(52):54695-701.
- Sosinsky GE, Solan JL, Gaietta GM, Ngan L, Lee GJ, Mackey MR, Lampe PD. (2007). The C-terminus of connexin43 adopts different conformations in the Golgi and gap junction as detected with structure-specific antibodies. *Biochem J.* 408(3):375-85.
- Southern EM. (1975). Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J Mol Biol.* 98(3):503-17.
- Spray DC, Burt JM. (1990). Structure-activity relations of the cardiac gap junction channel. *Am.J.Physiol* 258, C195-C205.
- Stevenson BR, Siliciano JD, Mooseker MS, Goodenough DA. (1986). Identification of ZO-1: a high molecular weight polypeptide associated with the tight junction (zonula occludens) in a variety of epithelia. *J Cell Biol.* 103(3):755-66.
- Stout C, Goodenough DA, Paul DL. (2004). Connexins: functions without junctions. *Curr Opin Cell Biol.* 16:507-12.

- Taliana L, Benezra M, Greenberg RS, Masur SK, Bernstein AM. (2005). ZO-1: lamellipodial localization in a corneal fibroblast wound model. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 46(1):96-103.
- Teixeira TF, da Silva TC, Fukumasu H, de Lima CE, Lúcia Zaidan Dagli M, Guerra JL. (2007). Histological alterations in the livers of Cx43-deficient mice submitted to a cholestasis model. *Life Sci* 81(5):380-4. Epub 2007 Jun 6.
- Temme A, Buchmann A, Gabriel HD, Nelles E, Schwarz M, Willecke K. (1997). High incidence of spontaneous and chemically induced liver tumors in mice deficient for connexin32. *Curr.Biol.* 7, 713-716.
- Teubner B, Euwens C, Huston J, Steinhäuser C, Messing A, Heinemann U, Willecke K. (2003). Accelerated hippocampal spreading depression and enhanced locomotory activity in mice with astrocyte-directed inactivation of connexin43. *J.Neurosci.* 23, 766-776.
- Theis M, Mas C, Döring B, Krüger O, Herrera P, Meda P, Willecke K. (2001). General and conditional replacement of connexin43-coding DNA by a LacZ reporter gene for cell-autonomous analysis of expression. *Cell Commun.Adhes.* 8, 383-386.
- Theis M, Jauch R, Zhuo L, Speidel D, Wallraff A, Döring B, Frisch C, Söhl G, Teubner B, Euwens C, Huston J, Steinhäuser C, Messing A, Heinemann U, Willecke K. (2003). Accelerated hippocampal spreading depression and enhanced locomotory activity in mice with astrocyte-directed inactivation of connexin43. *J.Neurosci.* 23, 766-776.
- Theis M, Mas C, Döring B, Degen J, Brink C, Caille D, Charollais A, Krüger O, Plum A, Nepote V, Herrera P, Meda P, Willecke K. (2004). Replacement by a LacZ reporter gene assigns mouse connexin36, 45 and 43 to distinct cell types in pancreatic islets. *Exp Cell Res.* 2004 294(1):18-29.
- Theis M, Söhl G, Eiberger J, Willecke K. (2005). Emerging complexities in identity and function of glial connexins. *Trends Neurosci.* 28(4):188-95.
- Thomas MA, Zosso N, Scerri I, Demareux N, Chanson M, Staub O. (2003). A tyrosine-based sorting signal is involved in connexin43 stability and gap junction turnover. *J.Cell Sci.* 116, 2213-2222.
- Thomas SA, Schuessler RB, Berul CI, Beardslee MA, Beyer EC, Mendelsohn ME, Saffitz JE. (1998). Disparate effects of deficient expression of connexin43 on atrial and ventricular conduction: evidence for chamber-specific molecular determinants of conduction. *Circulation.* 97(7):686-91.
- Toyofuku T., Yabuki,M., Otsu,K., Kuzuya,T., Hori,M., Tada,M. (1998). Direct association of the gap junction protein connexin-43 with ZO-1 in cardiac myocytes. *J.Biol.Chem.* 273, 12725-12731.
- Tronche F, Casanova E, Turiault M, Sahly I, Kellendonk C. (2002). When reverse genetics meets physiology: the use of site-specific recombinases in mice. *FEBS Lett.* 529:116-121.
- Tsapara A, Matter K, Balda MS. (2006). The heat-shock protein Apg-2 binds to the tight junction protein ZO-1 and regulates transcriptional activity of ZONAB. *Mol Biol Cell.* 17(3):1322-30.
- Toyofuku T, Akamatsu Y, Zhang H, Kuzuya T, Tada M, Hori M. (2001). c-Src regulates the interaction between connexin-43 and ZO-1 in cardiac myocytes. *J.Biol.Chem.* 276, 1780-1788.

- Umeda K, Matsui T, Nakayama M, Furuse K, Sasaki H, Furuse M, Tsukita S. (2004). Establishment and characterization of cultured epithelial cells lacking expression of ZO-1. *J Biol Chem.* 279(43):44785-94.
- Umeda K, Ikenouchi J, Katahira-Tayama S, Furuse K, Sasaki H, Nakayama M, Matsui T, Tsukita S, Furuse M, Tsukita S. (2006). ZO-1 and ZO-2 independently determine where claudins are polymerized in tight-junction strand formation. *Cell.* 126(4):741-54.
- Utepbergenov DI, Fanning AS, Anderson JM. Dimerization of the scaffolding protein ZO-1 through the second PDZ domain. *J Biol Chem.* 281(34):24671-7.
- Vaidya D, Tamaddon HS, Lo CW, Taffet SM, Delmar M, Morley GE, Jalife J. (2001). Null mutation of connexin43 causes slow propagation of ventricular activation in the late stages of mouse embryonic development. *Circ.Res.* 88, 1196-1202.
- Valiunas V, Polosina YY, Miller H, Potapova IA, Valiuniene L, Doronin S, Mathias RT, Robinson RB, Rosen MR, Cohen IS, Brink PR. (2005) Connexin-specific cell-to cell transfer of short interfering RNA by gap junctions. *J Physiol.* 568:459-68.
- van Veen AA, van Rijen HV, Opthof T. (2001). Cardiac gap junction channels: modulation of expression and channel properties. *Cardiovasc Res.* 51: 217-29.
- van Rijen HV, Eckardt D, Degen J, Theis M, Ott T, Willecke K, Jongsma HJ, Opthof T, de Bakker JM. (2004). Slow conduction and enhanced anisotropy increase the propensity for ventricular tachyarrhythmias in adult mice with induced deletion of connexin43. *Circulation.* 109(8):1048-55.
- von Maltzahn J. (2008). Erzeugung und Untersuchung neuer transgener Mausmutanten zur Expression und Funktion der Connexine während der Myogenese. Dissertation an der Rheinischen-Friedrich-Wilhelms Universität.
- Wagner C. (2008). Function of connexins in the renal circulation. *Kidney Int.* 73:547-55.
- Waldo KL, Lo CW, Kirby ML. (1999). Connexin 43 expression reflects neural crest patterns during cardiovascular development. *Dev.Biol.* 208, 307-323.
- Wallraff A, Köhling R, Heinemann U, Theis M, Willecke K, Steinhäuser C. (2006). The impact of astrocytic gap junctional coupling on potassium buffering in the hippocampus. *J Neurosci.* 2006 May 17;26(20):5438-47.
- Wang X, Li L, Peracchia LL, Peracchia C. (1996). Chimeric evidence for a role of the connexin cytoplasmic loop in gap junction channel gating. *Pflugers Arch.* 431: 844-52.
- Wang YF, Daniel EE. (2001). Gap junctions in gastrointestinal muscle contain multiple connexins. *Am.J.Physiol Gastrointest.Liver Physiol* 281, G533-G543.
- Wang H, Ding T, Brown N, Yamamoto Y, Prince LS, Reese J, Paria BC. (2008). Zonula occludens-1 (ZO-1) is involved in morula to blastocyst transformation in the mouse. *Dev Biol.* 318(1):112-25.
- Warn-Cramer BJ, Lampe PD, Kurata WE, Kanemitsu MY, Loo LW, Eckhart W, Lau AF. (1996). Characterization of the mitogen-activated Protein kinase phosphorylation sites on the connexin-43 gap junction protein. *J. Biol. Chem.* 271 3779–3786.

- Wei CJ, Francis R, Xu X, Lo CW. (2005). Connexin43 associated with an N-cadherin-containing multiprotein complex is required for gap junction formation in NIH3T3 cells. *J Biol Chem.* 280(20):19925-36.
- Welcker J. (2004). Analysen zum Einfluss von Glykosphingolipiden auf die Expression und die Funktion von Gap Junction-Proteinen. Diplomarbeit an der Rheinischen-Friedrich-Wilhelms Universität.
- White TW, Sellitto C, Paul DL, Goodenough DA. (2001). Prenatal lens development in connexin43 and connexin50 double knockout mice. *Invest Ophthalmol.Vis.Sci.* 42, 2916-2923.
- Wilkie AL, Jordan SA, Jackson IJ. (2002). Neural crest progenitors of the melanocyte lineage: coat colour patterns revisited. *Development* 129, 3349-3357.
- Willecke K, Eiberger J, Degen J, Eckardt D, Romualdi A, Güldenagel M, Deutsch U, Söhl G. (2002). Structural and Functional Diversity of Connexin Genes in the Mouse and Human Genome. *Biol Chem.* 383: 725-737.
- Willecke K, Eiberger J and von Maltzahn J (2005). Connexin and Pannexin Genes in the Mouse and Human Genome. In: *Gap Junctions in Development and Disease*, Winterhager E (ed). Springer, pp. 1–12.
- Williams RL, Hilton DJ, Pease S, Willson TA, Stewart CL, Gearing DP, Wagner EF, Metcalf D, Nicola NA, Gough NM. (1988). Myeloid leukaemia inhibitory factor maintains the developmental potential of embryonic stem cells. *Nature* 336, 684-687.
- Wilmrig, M. (1985). LiCl-boiling method for plasmid minipreps. *Trends in Genetics* 1:158.
- Wimmer E, Hellen CU, Cao X. (1993). Genetics of poliovirus. *Annu Rev Genet.* 27:353-436.
- Winterhager E, Pielensticker N, Freyer J, Ghanem A, Schrickel JW, Kim JS, Behr R, Grümmer R, Maass K, Urschel S, Lewalter T, Tiemann K, Simoni M, Willecke K. (2007). Replacement of connexin43 by connexin26 in transgenic mice leads to dysfunctional reproductive organs and slowed ventricular conduction in the heart. *BMC Dev Biol.* 7:26.
- Wörsdörfer P, Maxeiner S, Markopoulos C, Kirfel G, Wulf V, Auth T, Urschel S, von Maltzahn J, Willecke K. (2008). Connexin expression and functional analysis of gap junctional communication in mouse embryonic stem cells. *Stem Cells.* 26(2):431-9.
- Wu CY, Hsieh HL, Sun CC, Tseng CP, Yang CM. (2008). IL-1 beta induces proMMP-9 expression via c-Src-dependent PDGFR/PI3K/Akt/p300 cascade in rat brain astrocytes. *J. Neurochem* 105(4):1499-512.
- Wu JC, Tsai RY, Chung TH. (2003). Role of catenins in the development of gap junctions in rat cardiomyocytes. *J.Cell Biochem.* 88, 823-835.
- Xie LJ, Huang GY, Zhao XQ, Shen Y, Zhou GM. (2005). Histopathological analysis of neonatal mouse hearts with connexin43 gene defects *Zhonghua Yi Xue Za Zhi.* 85(18):1249-51.
- Xu X, Li WE, Huang GY, Meyer R, Chen T, Luo Y, Thomas MP, Radice GL, Lo CW. (2001). Modulation of mouse neural crest cell motility by N-cadherin and connexin 43 gap junctions. *J.Cell Biol.* 154, 217-230.

- Xu J, Kausalya PJ, Phua DC, Ali SM, Hossain Z, Hunziker W. (2008). Early embryonic lethality of mice lacking ZO-2, but Not ZO-3, reveals critical and nonredundant roles for individual zonula occludens proteins in mammalian development. *Mol Cell Biol.* 28(5):1669-78.
- Ya J, Erdtsieck-Ernste EB, de Boer PA, van Kempen MJ, Jongsma H, Gros D, Moorman AF, Lamers WH. (1998). Heart defects in connexin43-deficient mice. *Circ.Res.* 82, 360-366.
- Yeager M. and Gilula NB. (1992). Membrane topology and quaternary structure of cardiac gap junction ion channels. *J. Mol. Biol.* 223, 929-948.
- Yi ZC, Wang H, Zhang GY, Xia B. (2007). Downregulation of connexin 43 in nasopharyngeal carcinoma cells is related to promoter methylation. *Oral Oncol.* 43(9):898-904.
- Yogo K, Ogawa T, Akiyama M, Ishida N, Takeya T. (2002). Identification and functional analysis of novel phosphorylation sites in Cx43 in rat primary granulosa cells. *FEBS Lett.* 531(2):132-6.
- Zeijl L, Ponsioen B, Giepmans BN, Ariaens A, Postma FR, Várnai P, Balla T, Divecha N, Jalink K, Moolenaar WH. (2007). Regulation of connexin43 gap junctional communication by phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate. *J Cell Biol.* 177(5):881-91.
- Zhang J.T., Nicholson,B.J. (1989). Sequence and tissue distribution of a second protein of hepatic gap junctions, Cx26, as deduced from its cDNA. *J.Cell Biol.* 109, 3391-3401.
- Zhang YW, Kaneda M, Morita I. (2003). The gap junction-independent tumorsuppressing effect of connexin 43. *J Biol Chem.* 278:44852-6.
- Zheng-Fischhöfer Q, Ghanem A, Kim JS, Kibschull M, Schwarz G, Schwab JO, Nagy J, Winterhager E, Tiemann K, Willecke K. (2006). Connexin31 cannot functionally replace connexin43 during cardiac morphogenesis in mice. *J Cell Sci.* 119(Pt 4):693-701.
- Zhou L, Kasperek EM, Nicholson BJ. (1999). Dissection of the molecular basis of pp60(v-src) induced gating of connexin 43 gap junction channels. *J.Cell Biol.* 144, 1033-1045.
- Zhou M, Kimelberg HK. (2001). Freshly isolated hippocampal CA1 astrocytes comprise two populations differing in glutamate transporter and AMPA receptor expression. *J Neurosci.* 21(20):7901-8.
- Zhou Y, Yang W, Lurtz MM, Ye Y, Huang Y, Lee HW, Chen Y, Louis CF, Yang JJ. (2007). Identification of the calmodulin binding domain of connexin 43. *J Biol Chem.* 282(48):35005-17.
- Zoidl G, Dermietzel R. (2002). On the search for the electrical synapse: a glimpse at the future. *Cell Tissue Res.* 310:137-42.

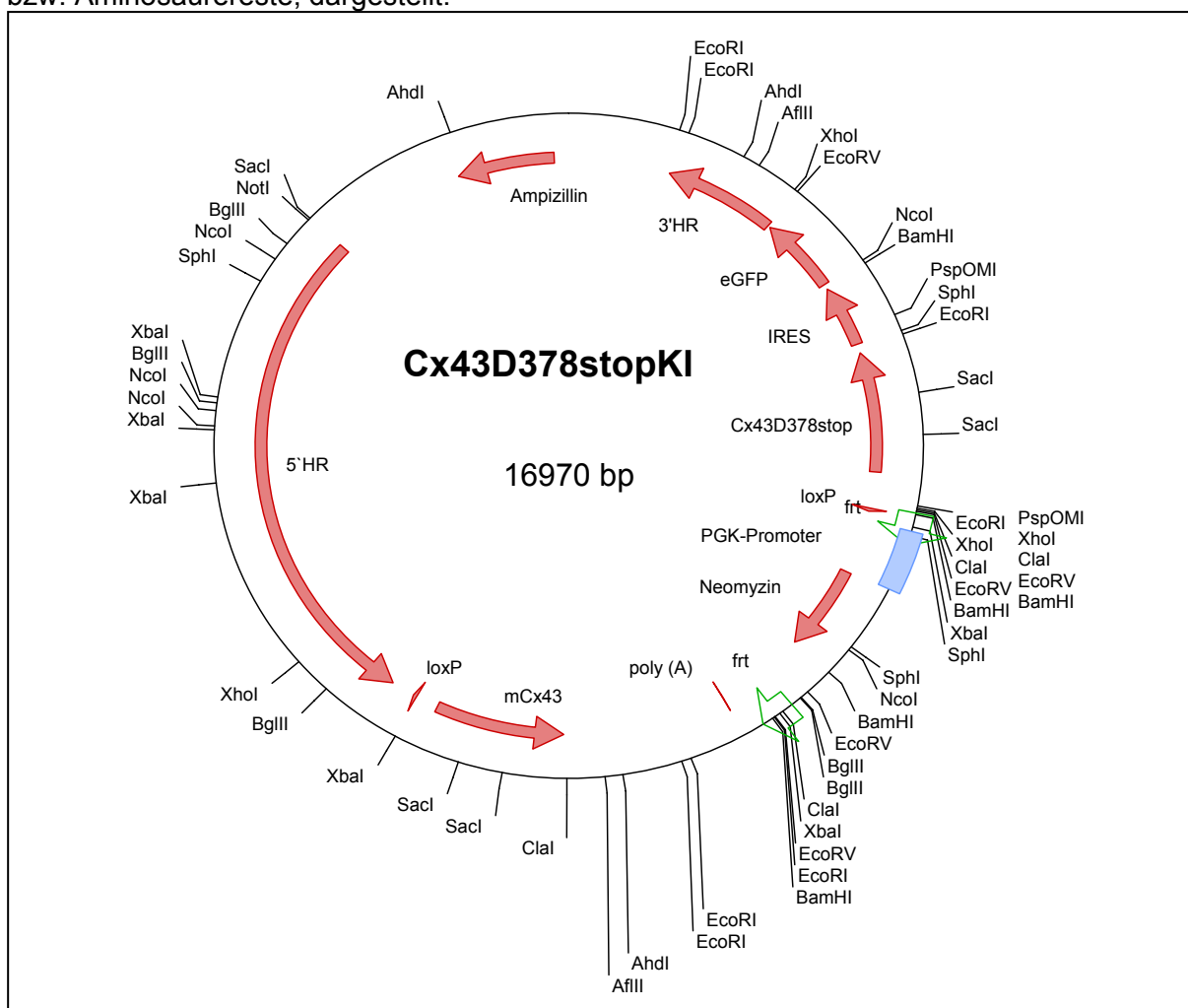
9 Anhang

CX43WT:

ATGGGTGACTGGAGCGCCTTGGGGAAGCTGCTGGACAAGGTCCAAGCCTACTCCACGGCCGGAGGGAAGGTGTGG
CTGTCCGGTGCTCTTCATTTTCAGAATCCTGCTCCTGGGGACAGCGGTTGAGTCAGCTTGGGGTGATGAACAGTCTGC
CTTTCGCTGTAACACTCAACAACCCGGTTGTGAAAATGTCTGCTATGACAAGTCCTTCCCCATCTCTCACGTGCGCTTC
TGGGTCTTCAGATCATATTCTGTCTGTGCCACACTCCTGTACTTGGCTCACGTGTTCTATGTGATGAGAAAGGAA
GAGAAGCTGAACAAGAAAGAAGAGGAGCTCAAAGTGGCGCAGACCGGACGGGGTCAACGTGGAGATGCACCTGAAGC
AGATTGAAATCAAGAAGTTCAAGTATGGGATTGAAGAACACGGCAAGGTGAAGATGAGAGGTGGCCTGCTGAGAACC
TACATCATCAGCATCCTCTCAAGTCTGTCTTCGAGGTGGCCTTCCTGCTGATCCAGTGGTACATCTATGGGTTTCAGC
CTGAGTGCGGTCTACACCTGCAAGAGAGATCCCTGCCCCACCAGGTGGACTGCTTCTCTCACGTCCCACGGAGAA
AACCATCTTCATCATCTTCATGCTGGTGGTGTCTTGGTGTCTCTCGCTCTGAATATCATTGAGCTCTTCTATGTCTTCT
TC**AAGGGCGTTAAGGATCGCGTGAAGGGAAGA**AGCGATCCTTACCACGCCACCACCGGCC**CCACTGAGCCCA**TCCA
AAGACTGCGGATCTCCAAAATATGCTTACTTCAATGGCTGCTCCTCACCAACGGCCCCACTCTCACCTATGTCTCCTC
CTGGGTACAAGCTGGTCACTGGTGACAGAAACAATTCTCCTGCCGCAATTACAACAAGCAAGCCAGCGAGCAAAAC
TGGGCGAATTACAGCGCAGAGCAAAATCGAATGGGGCAGGCCGGAAGCACCATCTCCAACCTCCACGCCAGCCGT
TTGATTCCCTGACGACAGCCAAAATGCCAAAAAAGTTGCTGCTGGACACGAACTCCAGCCCTTAGCTATCGTGGATC
AGCGACCTTCCAGCAGAGCCAGCAGCCGCGCCAGCAGACCTCGGCCT**GATGACCTGGAGATTAA**

MGDWSALGKLLDKVQAYSTAGGKVWLSVLFIFRILLGLTAVESAWGDEQSAFRCNTQQPGCENVCYDKSFPISHVRFWVL
QIIFVSVPTLLYLAVFYVMRKEEKLNKKEELKVAQTDGVNVMHLKQIEIKFKYGIEEHGKV/KMRGGLLRITYIISILFKSVF
EVAFLLIQWYIYGFSLSAVYTCKRDPCHQVDCFLSRPTEKTIIFIMLVSLVSLALNIIELFYVFF**KGVKDRVKGR**SDPYHAT
TG**PLSP**SKDCGSPKYAYFNGCSSPTAPLSPMSPPGYKLVTGDRNNSCRNYNKQASEQNWANYSAEQNRMGQAGSTIS
NSHAQPFDFPDDSQNAKKVAAGHELQPLAIVDQRPSSRASSRASSRPRP**DDLEI***

Basen- und Aminosäuresequenz des WT-*Gja1*-Gens bzw. des WT-Cx43-Proteins. In rot sind das Start- und Stopcodon, und unterstrichen und fett, die in dieser Arbeit deletierten Basen bzw. Aminosäurereste, dargestellt.



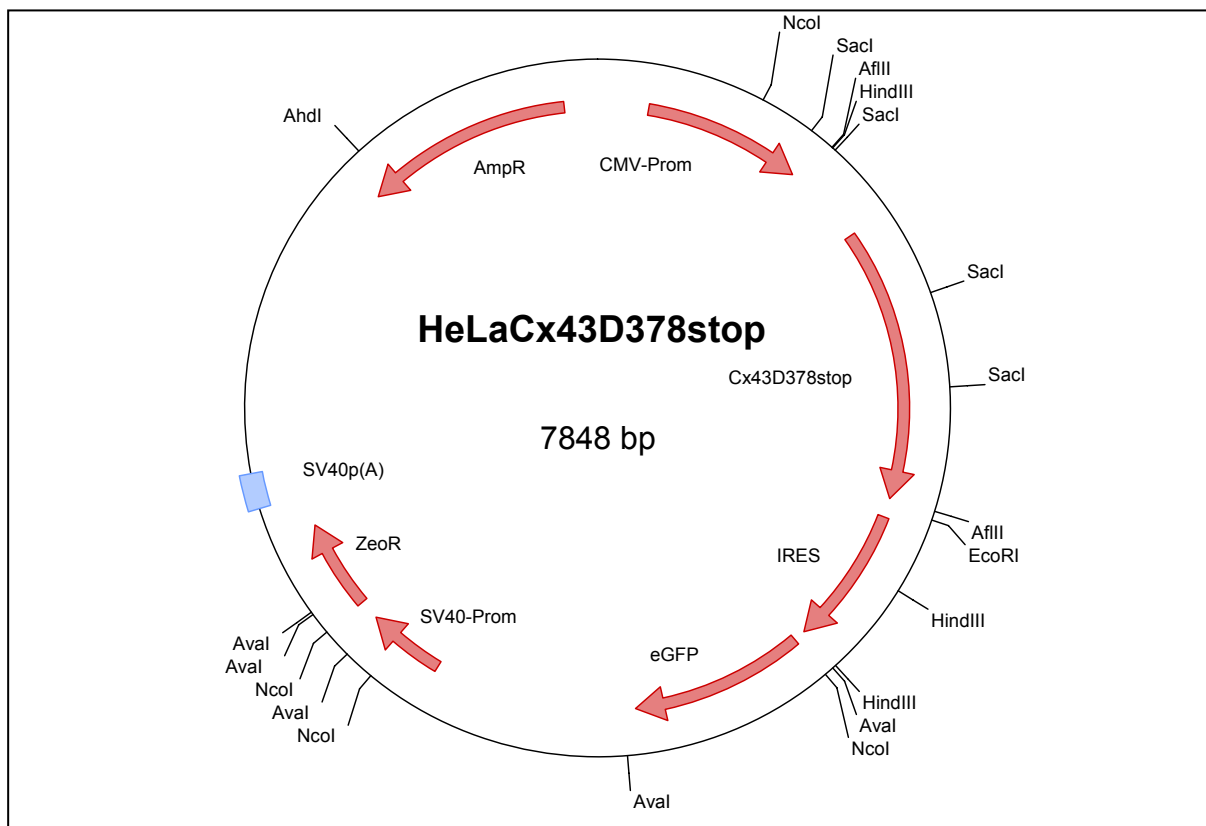
Plasmidkarte des Cx43D378stopKI Vektors mit allen während der Klonierung und der abschließenden Restriktionsspaltungen benutzten Restriktionsenzymen.

Cx43D378stop:

ATGGGTGACTGGAGCGCCTTGGGGAAGCTGCTGGACAAGGTCCAAGCCTACTCCACGGCCGGAGGGAAGGTGTGG
CTGTGGTGTCTTTCATTTTCAGAATCCTGCTCCTGGGGACAGCGGTTGAGTCAGCTTGGGGTGATGAACAGTCTGC
CTTTCGCTGTAACACTCAACAACCCGGTTGTGAAAATGTCTGCTATGACAAGTCCTTCCCCATCTCTCACGTGCGCTTC
TGGGTCTTCAGATCATATTCGTGTCTGTGCCACACTCCTGTACTTGGCTCACGTGTTCTATGTGATGAGAAAGGAA
GAGAAGCTGAACAAGAAAGAAGAGGAGCTCAAAGTGGCGCAGACCGACGGGGTCAACGTGGAGATGCACCTGAAGC
AGATTGAAATCAAGAAGTTCAAGTATGGGATTGAAGAACACGGCAAGGTGAAGATGAGAGGTGGCCTGCTGAGAACC
TACATCATCAGCATCCTCTTCAAGTCTGTCTTCGAGGTGGCCTTCTGCTGATCCAGTGGTACATCTATGGGTTTCAGC
CTGAGTGCAGGTCTACACCTGCAAGAGAGATCCCTGCCCCACCAGGTGGACTGTTCTCTCACGTCCCACGGAGAA
AACCATCTTCATCATCTTCATGCTGGTGGTGTCTTGGTGTCTCTCGCTCTGAATATCATTGAGCTCTTCTATGTCTTCT
TCAAGGGCGTTAAGGATCGCGTGAAGGGAAGAAGCGATCCTTACCACGCCACCACCGGCCACTGAGCCCATCCAA
AGACTGCGGATCTCCAAAATATGCTTACTTCAATGGCTGCTCCTCACCACGGCCCCACTCTCACCTATGTCTCCTCC
TGGGTACAAGCTGGTCACTGGTGACAGAAAACATTCCTCCTGCCGCAATTACAACAAGCAAGCCAGCGAGCAAAACT
GGGCGAATTACAGCGCAGAGCAAAATCGAATGGGGCAGGCCGGAAGCACCATCTCCAACCTCCACGCCCAGCCGTT
TGATTTCCCTGACGACAGCCAAAATGCCAAAAAGTTGCTGCTGGACACGAACTCCAGCCCTTAGCTATCGTGGATCA
GCGACCTTCCAGCAGAGCCAGCAGCCGCGCCAGCAGCAGACCTCGGCCCTTAAG

MGDWSALGKLLDKVQAYSTAGGKVWLSVLFIFRILLGTAVESAWGDEQSAFRCNTQQPGCENVCYDKSFPISHVRFWVL
QIIFVSVPTLLYLAHVYFVYMRKEELKNKKEELKVAQTDGVNEMHLKQIEIKKFKYGIEEHGKVKMRGGLRTYIISILFKSVF
EVAFLLIQWYIYGFLSAVYTCKRDPCHQVDCFLSRPTEKTIIFIMLVSLVSLALNIIELFYVFFKGVKDRVKGRSDPYHAT
TGPLSPSKDCGSPKYAYFNGCSSPTAPLSPMSPGYKLVTDGRNNSCRNYNKQASEQNWANYSAEQNRMGQAGSTIS
NSHAQPFDFPDDSQNAKKVAAGHELQPLAIVDQRPSSRASSRASSRPRP*

Veränderte Sequenz des *Gja1D378stop*-Gens (unterstrichen, die zusätzlich eingefügte *Afl* Restriktionsstelle) und die veränderte Aminosäuresequenz des Cx43D378stop-Proteins.



Plasmidkarte des HeLaCx43D378stop Vektors mit allen während der Klonierung und der abschließenden Restriktionsspaltungen benutzten Restriktionsenzymen.

Cx43(Δ234-243):

ATGGGTGACTGGAGCGCCTTGGGGAAGCTGCTGGACAAGGTCCAAGCCTACTCCACGGCCGGAGGGA
AGGTGTGGCTGTGCGGTGCTCTTCATTTTCAGAATCCTGCTCCTGGGGACAGCGGTTGAGTCAGCTTGG
GGTGATGAACAGTCTGCCTTTTCGCTGTAACTCAACAACCCGGTTGTGAAAATGTCTGCTATGACAAGT
CCTTCCCCATCTCTCACGTGCGCTTCTGGGTCCTTCAGATCATATTCGTGTCTGTGCCCACACTCCTGTA
CTTGGCTCACGTGTTCTATGTGATGAGAAAGGAAGAGAAGCTGAACAAGAAAGAAGAGGAGCTCAAAGT
GGCGCAGACCGACGGGGTCAACGTGGAGATGCACCTGAAGCAGATTGAAATCAAGAAGTTCAAGTATG
GGATTGAAGAACACGGCAAGGTGAAGATGAGAGGTGGCCTGCTGAGAACCTACATCATCAGCATCCTC
TTCAAGTCTGTCTTCGAGGTGGCCTTCTGCTGATCCAGTGGTACATCTATGGGTTTCAGCCTGAGTGCG
GTCTACACCTGCAAGAGAGATCCCTGCCCCCACCAGGTGGACTGCTTCCTCTCACGTCCCACGGAGAA
AACCATCTTCATCATCTTCATGCTGGTGGTGTCTTGGTGTCTCTCGCTCTGAATATCATTGAGCTCTTCT
ATGTCTTCTTCAGCGATCCTTACCACGCCACCACCGGCCACTGAGCCCATCCAAAGACTGCGGATCTC
CAAAATATGCTTACTTCAATGGCTGCTCCTCACCACGGGCCACTCTCACCTATGTCTCTCCTGGGTA
CAAGCTGGTACTGGTGACAGAAACAATTCTCCTGCGCAATTACAACAAGCAAGCCAGCGAGCAAAA
CTGGGCGAATTACAGCGCAGAGCAAAATCGAATGGGGCAGGCCGGAAGCACCATCTCCAACCTCCACG
CCCAGCCGTTTGATTTCCCTGACGACAGCCAAAATGCCAAAAAAGTTGCTGCTGGACACGAACTCCAGC
CCTTAGCTATCGTGGATCAGCGACCTTCCAGCAGAGCCAGCAGCCGCGCCAGCAGCAGACCTCGGCCT
GATGACCTGGAGATT**TAA**

MGDWSALGKLLDKVQAYSTAGGKVWLSVLFIFRILLGTAVESAWGDEQSAFRCNTQQPGCENVCYDKSFP
ISHVRFWVLQIIFVSVPTLLYLAHVYVMRKEEKLNKEEELKVAQTDGVNVEMHLKQIEIKFKYGIEEHGKV
KMRGGLLRTYIISILFKSVFEVAFLLIQWYIYGFSLSAVYTCKRDPCHQVDCFLSRPTEKTIFIFMLVSVLSLA
LNIIELFYVFFSDPYHATTGPLSPKDCGSPKYAYFNGCSSPTAPLSPMSPPGYKLVTGDRNNSSCRNYNKQ
ASEQNWANYSAEQNRMGQAGSTISNSHAQPFDFPDDSQNAKKVAAGHELQPLAIVDQRPSSRRASSR
PRPDDLEI*

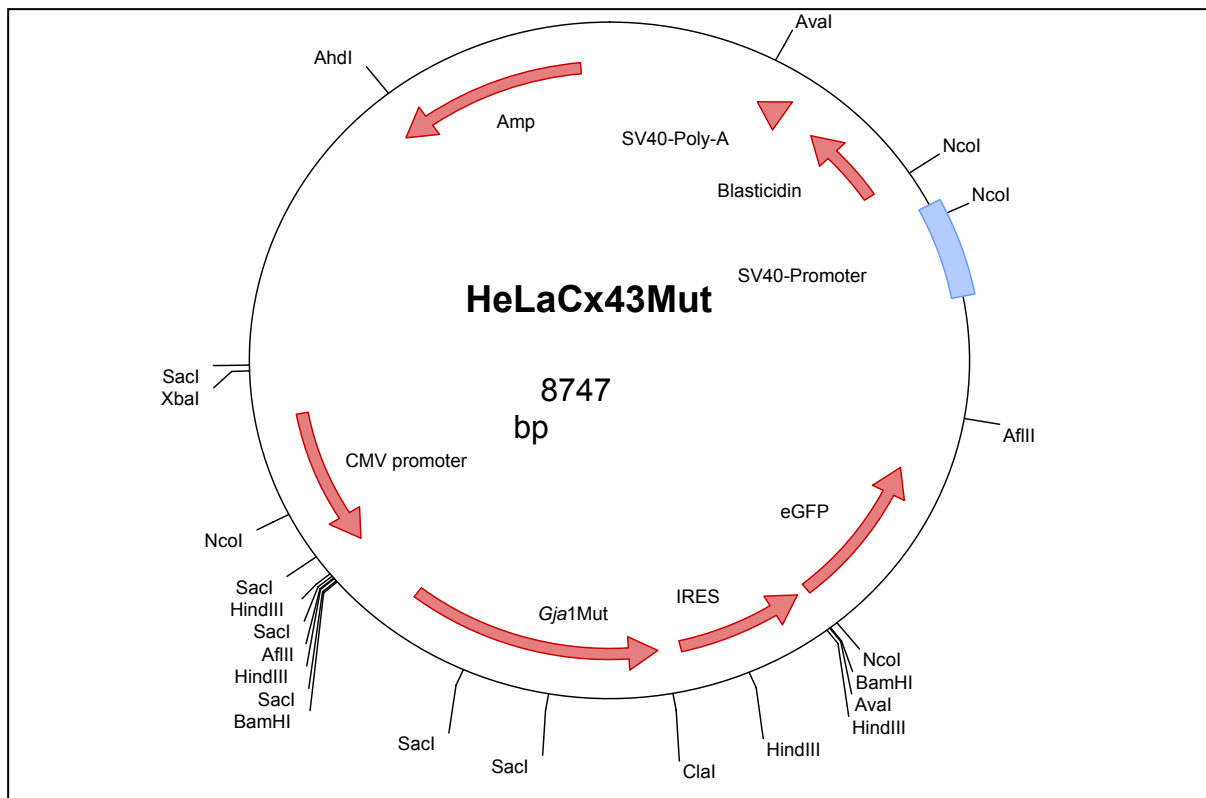
Veränderte Sequenz des *Gja1*_(Δ234 – 243)-Gens und die veränderte Aminosäuresequenz des Cx43_(Δ234 – 243)-Proteins.

Cx43(Δ254-257):

ATGGGTGACTGGAGCGCCTTGGGGAAGCTGCTGGACAAGGTCCAAGCCTACTCCACGGCCGGAGGGA
AGGTGTGGCTGTGCGGTGCTCTTCATTTTCAGAATCCTGCTCCTGGGGACAGCGGTTGAGTCAGCTTGG
GGTGATGAACAGTCTGCCTTTTCGCTGTAACTCAACAACCCGGTTGTGAAAATGTCTGCTATGACAAGT
CCTTCCCCATCTCTCACGTGCGCTTCTGGGTCCTTCAGATCATATTCGTGTCTGTGCCCACACTCCTGTA
CTTGGCTCACGTGTTCTATGTGATGAGAAAGGAAGAGAAGCTGAACAAGAAAGAAGAGGAGCTCAAAGT
GGCGCAGACCGACGGGGTCAACGTGGAGATGCACCTGAAGCAGATTGAAATCAAGAAGTTCAAGTATG
GGATTGAAGAACACGGCAAGGTGAAGATGAGAGGTGGCCTGCTGAGAACCTACATCATCAGCATCCTC
TTCAAGTCTGTCTTCGAGGTGGCCTTCTGCTGATCCAGTGGTACATCTATGGGTTTCAGCCTGAGTGCG
GTCTACACCTGCAAGAGAGATCCCTGCCCCCACCAGGTGGACTGCTTCCTCTCACGTCCCACGGAGAA
AACCATCTTCATCATCTTCATGCTGGTGGTGTCTTGGTGTCTCTCGCTCTGAATATCATTGAGCTCTTCT
ATGTCTTCTTCAAGGGCGTTAAGGATCGCGTGAAGGGAAGAAGCGATCCTTACCACGCCACCACCGGC
TCCAAAGACTGCGGATCTCCAAAATATGCTTACTTCAATGGCTGCTCCTCACCACGGGCCACTCTCA
CCTATGTCTCCTCCTGGGTACAAGCTGGTCACTGGTGACAGAAACAATTCTCCTGCCGCAATTACAAC
AAGCAAGCCAGCGAGCAAACTGGGCGAATTACAGCGCAGAGCAAAATCGAATGGGGCAGGCCGGAA
GCACCATCTCCAACCTCCACGCCAGCCGTTTGATTTCCCTGACGACAGCCAAAATGCCAAAAAAGTTG
CTGCTGGACACGAACTCCAGCCCTTAGCTATCGTGGATCAGCGACCTTCCAGCAGAGCCAGCAGCCGC
GCCAGCAGCAGACCTCGGCCTGATGACCTGGAGATT**TAA**

MGDWSALGKLLDKVQAYSTAGGKVWLSVLFIFRILLGTAVESAWGDEQSAFRCNTQQPGCENVCYDKSFP
ISHVRFWVLQIIFVSVPTLLYLAHVYVMRKEEKLNKEEELKVAQTDGVNVEMHLKQIEIKFKYGIEEHGKV
KMRGGLLRTYIISILFKSVFEVAFLLIQWYIYGFSLSAVYTCKRDPCHQVDCFLSRPTEKTIFIFMLVSVLSLA
LNIIELFYVFFKGVKDRVKGRSDPYHATTGSKDCGSPKYAYFNGCSSPTAPLSPMSPPGYKLVTGDRNNSSC
RNYNKQASEQNWANYSAEQNRMGQAGSTISNSHAQPFDFPDDSQNAKKVAAGHELQPLAIVDQRPSSRAS
SRASSRPRPDDLEI*

Veränderte Sequenz des *Gja1*_(Δ253 – 256)-Gens und die veränderte Aminosäuresequenz des Cx43_(Δ253 – 265)-Proteins.



Plasmidkarte des HeLaCxMut Vektors mit allen während der Klonierung und der abschließenden Restriktionsspaltungen benutzten Restriktionsenzymen. Dieser Vektor ist für die beiden Cx43-Deletionsmutanten Cx43_(Δ234 – 243) und Cx43_(Δ253 – 265) gleich, nur die *Gja1*-Sequenzen sind entsprechend verändert.